

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid



**Estudio de la regulación de la
proliferación y la formación de
patrón en el desarrollo del
abdomen por los genes Hox
Ultrabithorax y *abdominal-A* de
*Drosophila melanogaster***

Memoria presentada por
Delia Del Saz Soler
para optar al grado de Doctor en Ciencias por
la Universidad Autónoma de Madrid

27 de Junio de 2017

Director de Tesis:
Ernesto Sánchez-Herrero Arbide

INDICE

Abreviaturas.....	pág.7
Resumen.....	pág.9
Summary.....	pág.11
Introducción	
1. La Biología del Desarrollo y <i>Drosophila melanogaster</i>	pág.13
2. Ciclo vital de <i>Drosophila melanogaster</i>	pág.14
3. Discos imaginales y nidos de histoblastos.....	pág.14
4. Establecimiento de la organización segmental en <i>Drosophila melanogaster</i>	pág.16
5. Los genes Hox	pág.18
6. Discos e histoblastos: establecimiento del patrón y crecimiento.....	pág.20
6.1 Discos imaginales.....	pág.21
6.2 Nidos de histoblastos.....	pág.24
7. Genes Hox y desarrollo del abdomen en <i>Drosophila</i>	pág.26
Objetivos.....	pág.29
Material y Métodos	
1. Cepas de moscas	
1.1 Líneas Gal4.....	pág.31
1.2 Líneas UAS.....	pág.31
1.3 Líneas lacZ.....	pág.31
1.4 Líneas ARNi.....	pág.32
1.5 Líneas mutantes	pág.32
2. Experimentos de cambio de temperatura	pág.32
3. Análisis clonal	
3.1 Clones de falta de función.....	pág.33
3.2 Inducción de clones de expresión ectópica.....	pág.36
4. Análisis de las cutículas de adultos.....	pág.39
5. Inmunohistoquímica	
5.1 Anticuerpos primarios	pág.39
5.2 Anticuerpos secundarios.....	pág.39
5.3 Montaje de embriones.....	pág.40
5.4 Disección y montaje de epidermis larvaria y epidermis pupaL 0h DFP	pág.40

5.5 Disección y montaje de discos imaginales de larva o pupa 0h DFP	pág.41
5.6 Disección y montaje de pupas.....	pág.41
5.7 Incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU).....	pág.42
6. Adquisición y tratamiento de imágenes	
6.1 Adquisición de fotografías.....	pág.43
6.2 Adquisición de películas <i>in-vivo</i>	pág.43
7. Análisis estadístico.....	pág.43
Resultados	
1. Transformación de tejido presuntivo de tórax en tejido de abdomen	pág.45
1.1 Expresión ectópica de <i>abd-A</i>	pág.46
1.1.1 Fenotipos adultos.....	pág.46
1.1.2 Expresión ectópica de <i>abd-A</i> y proliferación celular.....	pág.48
I. Expresión ectópica de <i>abd-A</i> en la región presuntiva de notum del disco de ala y análisis de marcadores de ciclo celular en estadio de larva III tardía (L3t).....	pág.48
II. Inducción de clones de sobre-expresión de <i>abd-A</i> en el disco imaginal de ala.....	pág.52
III. Análisis de apoptosis y cambio de tamaño celular en condiciones de expresión ectópica de <i>abd-A</i>	pág.55
IV. Expresión ectópica de <i>abd-A</i> en el primordio del disco de ala y análisis del marcador de ciclo celular pH3 en estadios pupales.....	pág.57
V. Expresión ectópica de <i>abd-A</i> en el primordio del disco de ala y análisis del tamaño celular tras la entrada en pupación.....	pág.59
1.1.3 <i>abd-A</i> como inductor de destino abdominal: regulación de la expresión de marcadores de diferenciación específicos de abdomen.....	pág.61
1.1.4 <i>abd-A</i> como inductor de destino abdominal: distorsión del patrón característico de notum.....	pág.63
1.2 Expresión ectópica de <i>Ubx</i>	pág.67
2. Transformación de tejido presuntivo de abdomen en tejido torácico	
2.1 Papel de <i>abd-A</i> en el desarrollo de los nidos de histoblastos.....	pág.68
2.1.1 Silenciamiento de la expresión del gen <i>abd-A</i> mediante el uso de ARN de interferencia.....	pág.68
2.1.2 Inducción de clones mutantes para <i>abd-A</i>	pág.69
2.2 Función de <i>Ubx</i> en el desarrollo de los nidos de histoblastos.....	pág.70

2.2.1	Inducción de clones mutantes para <i>Ubx</i>	pág.71
2.2.2	Inducción de clones mutantes para el C-BX.....	pág.74
2.2.3	Silenciamiento de la expresión del gen <i>Ubx</i> mediante el uso de ARN de interferencia.....	pág.74
2.2.4	Silenciamiento de la expresión simultánea de los genes <i>Ubx</i> y <i>abd-A</i> mediante el uso de ARN de interferencia.....	pág.78
3.	Determinación de la función larvaria y pupal del gen <i>abd-A</i> en el desarrollo de la cutícula adulta.....	pág.80
a)	Expresión ectópica de <i>abd-A</i> en la región presuntiva de notum del disco imaginal de ala.....	pág.80
b)	Rescate de falta de función de <i>abd-A</i> en el abdomen.....	pág.81
4.	Aproximación experimental para el estudio del papel de <i>abd-A</i> y <i>Ubx</i> en el desarrollo de los nidos de histoblastos durante el desarrollo embrionario.....	pág.83
5.	Análisis de la expresión y actividad de <i>string</i> como inductor de la re-entrada en mitosis de de los nidos de histoblastos.....	pág.85
6.	Determinación de la función de los genes <i>Ubx</i> y <i>abd-A</i> en el desarrollo de la cutícula adulta cuando su silenciamiento se restringe al tejido larvario compuesto por las CELs.....	pág.88
Discusión		
1.	Los genes Hox y la regulación de la proliferación.....	pág.91
2.	Coordinación de crecimiento y formación de patrón.....	pág.93
3.	Requerimiento temporal de genes Hox.....	pág.95
4.	Genes Hox y requerimientos para formar el abdomen.....	pág.96
a)	Células larvarias e histoblastos: interacción y diferentes requerimientos de los genes Hox.....	pág.98
b)	Papel de la ecdisona para inducir proliferación de histoblastos y dar comienzo a la formación de patrón.....	pág.99
Conclusiones		pág.102
Conclusions		pág.104
Bibliografía.....		pág.106

ABREVIATURAS

abd-A: abdominal-A

ADN: ácido desoxirribnucleico

ADNc: ácido desoxirribnucleico
complementario

AFP: antes de la formación del pupario

A-P: antero-posterior

arm: armadillo

ARNi: ácido ribonucleico de interferencia

BrdU: Bromodeoxiuridina

C-BX: Complejo Bithorax

CEls (¡PONES EN EL TEXTO CEL O CELS?:
Células epidérmicas larvarias

Cyc-B: Ciclina-B

Cyc-E: Ciclina-E

DFP: después de la formación del pupario

D-V: dorso-ventral

esg: escargot

eyg: eyegone

FasIII: Fasciclina III

FLP: Flipasa

FRT: Flipase recombination target

hs: heat-shock

iab: infra-abdominal

L3t: Larva de tercer estadio tardío

MARCM: Mosaic Analysis with a
Repressible Cell Marker

min: minutos

nda: nido dorsal anterior

ndp: nido dorsal posterior

neu: neuralized

nv: nido ventral

omb: optomotor-blind

pH3: fosfo-Histona 3

pnr: pannier

sal: spalt

stg: string

trh: tracheless

ts: termosensible

tub: tubulina

UAS: upstream activating sequence

ubi: ubiquitina

Ubx: Ultrabithorax

wg: wingless

y: yellow

RESUMEN

Los genes Hox son una familia de genes altamente conservados que especifican la identidad segmental a lo largo del eje antero-posterior en todos los organismos bilaterales. Esto los convierte en buenos candidatos para dirigir los mecanismos que regulan el tamaño, la forma y la diferenciación. Por ejemplo, los genes Hox deben controlar la diferente tasa de división celular que tiene lugar en diferentes órganos y coordinarla con los mecanismos que regulan la formación del patrón. Este trabajo se propone analizar el papel de los genes Hox *Ultrabithorax* y *abdominal-A* de *Drosophila melanogaster* en la coordinación de estos procesos. Hemos estudiado cómo se controlan los diferentes comportamientos proliferativos de dos grupos de células de la mosca con diferentes ritmos de crecimiento: el área presuntiva del disco imaginal de ala, que forma el tórax adulto, y los histoblastos, que dan origen al abdomen. Los discos imaginales proliferan principalmente durante el período larvario, mientras que los histoblastos lo hacen durante el período pupal, permaneciendo quiescentes durante la larva. *Ultrabithorax* se expresa y requiere en el tórax posterior y en el primer segmento abdominal, mientras que la expresión de *abdominal-A* es necesaria en el segundo segmento abdominal y posteriores. La expresión ectópica de *abdominal-A* en la región proximal del disco imaginal del ala transforma el tórax en abdomen, pero las células no se dividen como histoblastos sino como células de disco. De forma recíproca, la falta de *Ultrabithorax* en el primer segmento abdominal hace que las células se desarrollen como torácicas (o como una estructura intermedia entre el tórax y el abdomen), pero los histoblastos no se dividen como las células de disco, sino que permanecen quiescentes. Es decir, en ambos casos la tasa de división celular no corresponde a la estructura que estas células formarán. Los estudios de los genes expresados en el tórax o el abdomen (*string*, *neuralized*, *wingless*, *eyegone*) apoyan la idea de que en estas transformaciones homeóticas, de abdomen a tórax o viceversa, las células de disco imaginal o los histoblastos, al menos durante el período larvario, no adquieren el patrón característico del segmento que van a diferenciar. Los experimentos de rescate de un fenotipo mutante *abdominal-A* indican que este gen no se requiere durante el período larvario, sino durante el pupal, para especificar un segmento abdominal; por el contrario, la conversión del tórax al abdomen requiere la actividad de este gen en ambos períodos. Por último, nuestro estudio de la función de los genes *Ultrabithorax* y *abdominal-A* ha demostrado que ambos son necesarios para conferir características morfológicas especiales a los histoblastos (forma de membrana, morfología nuclear), y que son redundantes para una función esencial en las células epidérmicas politénicas que rodean los nidos de histoblastos. Nuestro trabajo profundiza en el estudio de los mecanismos por los cuales los genes Hox coordinan la dinámica de crecimiento y la formación de patrón, así como en sus requerimientos temporales para el desarrollo de estructuras adultas.

SUMMARY

Hox genes are a highly conserved gene family, which specify segment identity along the antero-posterior axis in all bilateral organisms. This makes them good candidates to direct the mechanisms that regulate size, shape and differentiation. As an example, the Hox genes must control the different rate of division that takes place in different organs and coordinate it with the mechanisms that regulate pattern formation. In this work we propose to analyze the role of the genes Hox *Ultrabithorax* and *abdominal-A* of *Drosophila melanogaster* in the coordination of these processes. We have studied how they control the different proliferative behavior of two groups of cells of the fly with different growth rates: the presumptive notum area of the imaginal wing disc, which forms the adult thorax, and the histoblasts, which give rise to the abdomen. Imaginal discs proliferate mainly during the larval period while the histoblasts do so during the period of pupation, remaining quiescent during the larva. *Ultrabithorax* is expressed and required in the posterior thorax and first abdominal segment whereas *abdominal-A* expression is needed in the second and posterior abdominal segments. The ectopic expression of *abdominal-A* in the proximal region of the imaginal wing disc transforms the thorax into the abdomen, but the cells do not divide as histoblasts but as disc cells. Conversely, the lack of *Ultrabithorax* in the first abdominal segment makes the cells to develop as thoracic (or as an intermediate structure between the thorax and abdomen), but the histoblasts do not divide like the disc cells, but remain quiescent. That is, the rate of cell division does not correspond to the structure that these cells will form. Studies of genes expressed in the thorax or abdomen (*string*, *neuralized*, *wingless*, *eyegone*) support the idea that, in these homeotic transformations from the abdomen to the thorax or vice versa, imaginal disc cells or histoblasts, at least during the larval period, do not acquire the characteristic pattern of the segment to which they will differentiate. Experiments of rescue of an *abdominal-A* mutant phenotype indicate that this gene is not required during the larval period, but during the pupal one, to specify an abdominal segment; by contrast, conversion of the thorax to the abdomen requires the activity of this gene in both periods. Finally, our study of the function of the *Ultrabithorax* and *abdominal-A* genes has shown that both are needed to confer special morphological characteristics to histoblasts (membrane form, nuclear morphology), and that are redundant for an essential function in the polytene epidermal cells surrounding the histoblasts of the abdomen. Our work delves into the study of the mechanisms by which Hox genes coordinate growth dynamics and pattern formation, as well as their temporal requirements for the development of adult structures.

INTRODUCCIÓN

1. La Biología del Desarrollo y *Drosophila melanogaster*

La Biología del Desarrollo es la ciencia que ha surgido de la incesante búsqueda del ser humano por dar respuesta a las múltiples preguntas que despiertan nuestra curiosidad con respecto a la formación de los seres vivos, tales como qué procesos tienen lugar para coordinar el desarrollo de un organismo pluricelular completo. Partiendo de una única célula, los organismos pluricelulares se desarrollan dando lugar a múltiples tipos celulares que, a pesar de poseer el mismo material genético, no usan de la misma manera la información contenida en él. Esto es lo que determina las características propias de cada célula u órgano, tales como tamaño, forma y relación con el entorno, siendo la proliferación y diferenciación dos procesos morfogénicos clave que dirigen el desarrollo de un ser vivo. Por tanto, la Biología del Desarrollo además de estudiar principalmente cómo se regulan estos dos procesos, aborda también el estudio de los mecanismos implicados en comunicación intercelular, movimientos celulares o muerte programada que en ciertas ocasiones condicionan la consecución de los primeros.

Es sorprendente pensar que la diversidad de formas que existen en la naturaleza depende de procesos muy similares que tienen lugar en la escala molecular y celular y que son compartidos por organismos aparentemente muy diferentes entre sí. Más aún, los mecanismos morfogénicos y los genes que los coordinan están asimismo muy conservados (Carroll y col., 2001). Gracias a este hecho, la Biología del Desarrollo se sirve del uso de organismos modelo para poder descubrir procesos morfogénicos comunes a un gran número de seres vivos. Uno de los organismos modelo mejor conocidos, y que más ha contribuido a entender los procesos fundamentales del desarrollo, es la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*.

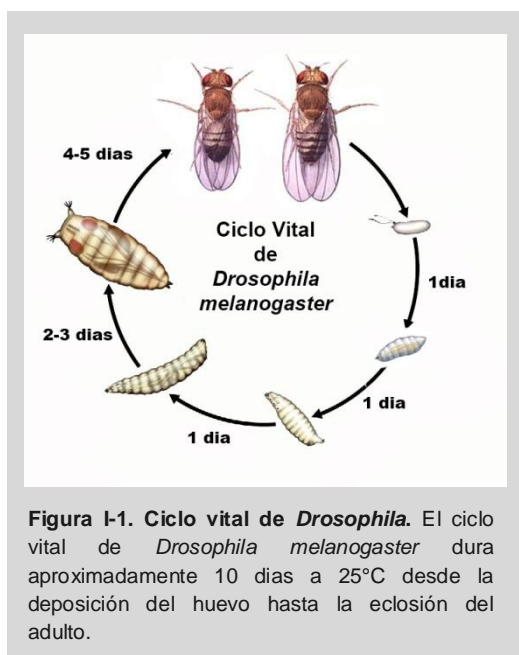
Fue T.H. Morgan quien, a comienzos del siglo XX, revolucionó el campo de la genética empleando *Drosophila* como organismo modelo. La elección fue un acierto ya que esta especie cuenta con numerosas ventajas, tales como: un fácil manejo, un pequeño tamaño (que permite un fácil almacenamiento y cría en laboratorio), un ciclo de vida muy corto (que permite estudiar varias generaciones en un corto periodo de tiempo), una alimentación que resulta sencilla y barata y una elevada fertilidad (las hembras pueden poner hasta 100 huevos al día). Para la realización de experimentos en Biología del Desarrollo presenta, además, ventajas adicionales:

- a) Un complemento genético sencillo (4 pares de cromosomas) con escaso número de secuencias repetitivas, lo cual facilita el abordaje genético de problemas de desarrollo.
- b) Cromosomas politénicos en sus glándulas salivares (y otros órganos), lo que permite que los cromosomas sean visualizados directamente (Bridges, 1935; Johnston, 2002).
- c) Existencia de cromosomas balanceadores, que impiden la recombinación meiótica, lo cual permite mantener indefinidamente cualquier modificación genética a lo largo de las sucesivas generaciones.
- d) Un exoesqueleto que proporciona numerosos marcadores morfológicos y que ha permitido seguir fácilmente numerosas mutaciones.
- e) Un gran conocimiento de su genoma (secuenciado en el año 2000, Adams y col., 2000) y su genética tras más de un siglo de investigaciones.
- f) Una gran batería de herramientas para su manipulación tales como:
 - i) Sistemas binarios de activación transcripcional: Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993), LexA/LexAop (LexO) (Lai y Lee, 2006) y QF/QS (Potter y col., 2010).
 - ii) Líneas de expresión de ARN interferente diseñadas para controlar el silenciamiento de genes (Adams y Sekelsky, 2002).
 - iii) El sistema FLP/FRT (Xu y Rubin, 1993), que facilita la inducción de clones de recombinación mitótica.

- iv) El sistema de clonaje mediante recombinación sitio-específica Gateway (Hartley y col., 2000; Petersen y Stowers, 2011).
- v) Las herramientas de edición genómica basadas en el sistema CRISPR/Cas9 (Kondo y Ueda, 2013).

Por otra parte, y gracias a la secuenciación a gran escala, se ha podido comprobar el gran grado de homología de su genoma con el de otras especies, lo que refuerza su uso en la investigación biomédica. Por ejemplo, un 68% de los genes conocidos responsables de enfermedades humanas tienen homólogos en *Drosophila* (Fortini y col., 2000; Johnston, 2002; Bier, 2005). Esta gran homología, y las demás características señaladas, demuestran que las rutas génicas que controlan los principales procesos del desarrollo son compartidas por la gran mayoría de organismos superiores y que *Drosophila* es un excelente organismo para su estudio.

2. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*



Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, lo cual quiere decir que sufre una metamorfosis completa, alcanzando su forma adulta desde un estadio larvario morfológicamente distinto. Su ciclo vital dura aproximadamente 10 días a 25°C (aunque el tiempo de desarrollo aumenta a temperaturas más bajas), en los que pasa por un estadio embrionario, que dura 24h, tres fases larvarias [larva1 (L1), larva 2 (L2) y larva 3 (L3)] que duran en su conjunto alrededor de 5 días, y un periodo de metamorfosis o pupación que dura en torno a 5 días también (Fig. I-1). Durante las fases larvarias, las larvas aumentan considerablemente su tamaño y en su interior se desarrollan las células imaginales, que se determinan previamente en el embrión y que durante la metamorfosis darán lugar a la mayor parte del esqueleto externo de la mosca (y otras

estructuras) (Nöthiger, 1972; Cohen, 1993; Held, 2005; Beira y Paro, 2016). En torno al quinto día de su desarrollo la larva deja de comer, busca un lugar seco e inicia la pupación. En este momento la cutícula externa se endurece y adquiere una tonalidad más oscura, proporcionando así una estructura protectora durante el proceso de metamorfosis, en el que los tejidos larvarios son, en su mayoría, degradados o histolizados, y se forman las estructuras adultas a partir de las células imaginales. Una vez completada la metamorfosis, la mosca adulta emerge del pupario. Alrededor de 8 horas más tarde, la mosca adulta es fértil y el ciclo vital se inicia de nuevo.

3. Discos imaginales y nidos de histoblastos

La mosca adulta se forma a partir de un proceso de metamorfosis completa en la que, como hemos indicado anteriormente, la mayor parte de los tejidos adultos de *Drosophila* derivan de las denominadas células imaginales, a partir de las cuales se desarrollará el exoesqueleto. Estas células, formadas a partir del ectodermo embrionario, se organizan en grupos de dos

maneras diferentes: disociados de la epidermis del embrión, o integrados en ella. A la primera estrategia de desarrollo corresponden los denominados discos imaginales (Fig. I-2). Estos son estructuras en forma de saco situados en el interior de la larva, formados por invaginación de este ectodermo, y que darán lugar a la mayor parte de los tejidos cuticulares del adulto, tales como la cabeza y el tórax, junto con todos sus apéndices (ojos, antenas, apéndices bucales, patas, alas, y halterios), la genitalia interna (excepto las gónadas), la genitalia externa y la analia (Nöthiger, 1972; Cohen, 1993; Held, 2005; Beira y Paro, 2016). A la segunda estrategia pertenecen, entre otros primordios, los “nidos” de histoblastos, grupos celulares que se disponen embebidos en la epidermis y que darán lugar a las estructuras cuticulares del abdomen (Fig. I-2) (Madhavan y Schneidermann, 1977; Cohen, 1993). Como se comentará más adelante en detalle, los discos comienzan a proliferar activamente durante la fase larvaria (Madhavan y Schneidermann 1977), para detener esta proliferación activa en la pupa, en la que realizan su diferenciación (Cohen, 1993). Los histoblastos, por su parte, permanecerán en un estado quiescente durante el periodo larvario hasta el comienzo de la pupación, en la que se produce su explosión proliferativa para sustituir a las células abdominales larvarias (García-Bellido y Merriam, 1971; Guerra y col., 1973; Madhavan y Schneiderman, 1977; Madhavan y Madhavan, 1980).

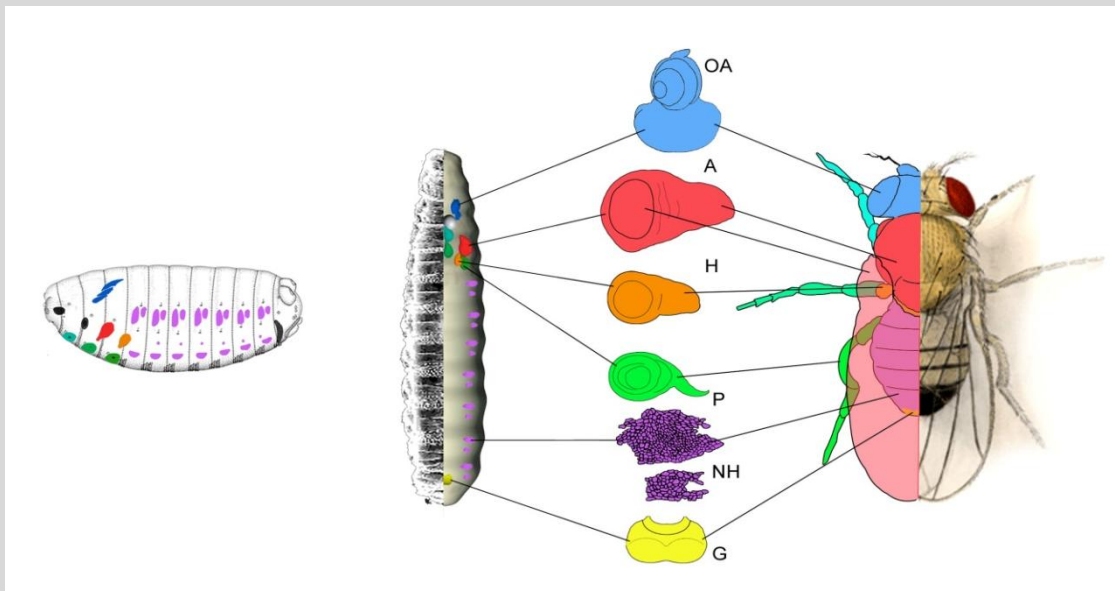


Figura I-2. Estructuras imaginales en *Drosophila melanogaster* : Representación esquemática de los discos imaginales y los nidos de histoblastos, su posición en el embrión (izquierda), en la larva (figura central), su morfología (ampliaciones) y la estructura adulta a la que dan lugar (derecha). Cada disco y sus derivados en el adulto, así como los histoblastos, están representados en el mismo color. Obsérvese que el disco de ala, en rojo, da origen al notum y al ala, que se representa transparente. Abreviaturas: OA, disco de ojo-antena; A, disco de ala; H, disco de halterio; P, disco de pata; NH, nidos de histoblastos; G, disco genital. (Imagen cedida por D.Foronda y modificada)

Los discos ofrecen varias ventajas para el estudio de diversos problemas biológicos. Las células imaginales son diploides, fáciles de aislar y manipular y permiten visualizar directamente la expresión de los genes implicados en la morfogénesis de las estructuras a las que darán lugar. Presentan un aspecto indiferenciado y poseen una capacidad única de mantener su estado determinado durante largos periodos de proliferación (Shearn y Garen, 1974). Además, la similitud de sus células con las células epiteliales que recubren los órganos del hombre potencia el valor de los descubrimientos realizados en estas estructuras. Es por todo ello que han sido, y continúan siendo, un modelo experimental de gran utilidad para

estudiar no sólo el desarrollo de *Drosophila*, sino también algunos de los principales problemas en biología celular y de desarrollo, tales como determinación y transdeterminación (Hadorn, 1965), establecimiento de mapas de destino (Bryant, 1975), formación de compartimentos (García-Bellido y col. 1973), competición celular (Morata y Ripoll, 1975), regeneración (Schubiger, 1971; Bergantiños y col., 2010; Worley y col. 2012) y la elucidación de diversas vías de señalización (Simon y col., 1991; Kumar, 2001; Perrimon y col., 2012). De forma significativa para nuestro trabajo, también han sido un modelo de cómo el ritmo de división celular a lo largo del desarrollo está acoplado al crecimiento y a la fijación de un determinado patrón morfológico (Serrano y O'Farrell, 1997; Lecuit y LeGoff, 2007; Restrepo y col., 2014; Irvine y Harvey, 2015). Y aunque la coordinación de estos procesos ha sido estudiada exhaustivamente en cultivos celulares, se sabe muy poco de lo que ocurre realmente en organismos vivos.

Por otro lado, la epidermis del abdomen presenta también diversas ventajas para su estudio. Presenta una polaridad celular uniforme y un amplio rango de destinos celulares identificables, lo que ha permitido diversos estudios de diferenciación, crecimiento y polaridad planar. Es, además, un epitelio cuyo desarrollo se puede visualizar mediante vídeos que muestran *in vivo* la evolución de diversos procesos celulares. Por todo ello, aunque la mayor parte de los estudios sobre los mecanismos que controlan y coordinan el crecimiento y la formación de patrón se han realizado en discos imaginales, el abdomen ha adquirido relevancia recientemente en estos análisis (Lawrence y col., 2004; Ninov y col., 2007; Ninov y col., 2009; Bischoff y Cseresnyés, 2009; Nakajima y col., 2011; Verma y Cohen, 2015).

Como todos los artrópodos, *Drosophila* presenta una estructura corporal organizada en segmentos. Los segmentos se definen en la fase embrionaria y mantienen una estructura genética fija, de forma que los cambios en organización y morfología que tienen lugar durante el desarrollo se producen sobre un patrón segmental que permanece constante. Hay, en general, una correspondencia directa entre lo que sucede en un segmento durante unas fases de desarrollo y otras, y los fenómenos que operan en una región corporal producen consecuencias observables en fases de desarrollo posteriores en el mismo segmento. Tanto los nidos de histoblastos como los discos imaginales tienen un origen segmental y son responsables de la formación de estructuras concretas. Es por ello por lo que se nombran según la región a la que van a dar lugar en el adulto. Así el disco de ala, por ejemplo, dará lugar al ala y notum del adulto, correspondiente al segundo segmento torácico, mientras que el nido espiracular del tercer segmento abdominal dará lugar al espiráculo de ese segmento concreto.

4. Establecimiento de la organización segmental en *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, como todos los insectos, presenta una división corporal segmental o metamérica. El control genético de este proceso de segmentación se ha estudiado en detalle en esta especie, e implica la activación de una cascada de regulación génica que ocurre antes de la celularización del blastodermo en el embrión (2.5-3h del desarrollo del huevo), es decir, cuando el embrión es un sincitio multinucleado. En estas etapas los productos de los genes maternos (*bicoid*, *nanos*, *torso*, etc.), depositados en el oocito en un patrón espacial particular establecido durante la ovogénesis, determinan los principales ejes corporales (antero-posterior (A-P) y dorso-ventral (D-V) del huevo). Mediante este proceso se configura un marco de información posicional que activa una cascada genética cigótica responsable del patrón corporal (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980; Frohnhofer y col., 1986; Nüsslein-Volhard, 1991; Morisato y Anderson, 1995).

Los primeros genes cigóticos en ser activados son los denominados **genes gap** (*hunchback*, *Krüppel*, *knirps*, etc.). Estos genes responden a la información posicional materna, codifican factores de transcripción, y su patrón de expresión divide al embrión en una serie de bandas transversales que definen amplios dominios (anterior, medio, posterior). La transición hacia una organización corporal segmentada comienza luego con la actividad de los **genes de la regla de los pares** (genes "pair-rule": *even-skipped*, *hairy*, *fushi tarazu*, etc.), cuyos dominios de expresión se especifican por las proteínas de los genes "gap" y dividen el eje corporal en 14 parasegmentos, manteniendo su expresión hasta la gastrulación (Akam, 1987; Ingham, 1988; Ingham y col., 1988). Los parasegmentos son regiones formadas por la parte posterior de un segmento y la anterior del siguiente y, además de ser unidades anatómicas, son también unidades de expresión génica (Martínez-Arias y Lawrence, 1985). Esta subdivisión parasegmental se mantiene gracias a la activación de la expresión de los **genes de polaridad segmental** (*wingless* (*wg*), *hedgehog* (*hh*), *engrailed* (*en*), etc.), que se transcriben en dominios restringidos dentro de cada parasegmento y que son inducidos por los genes de la regla de los pares (Fig. I-3).

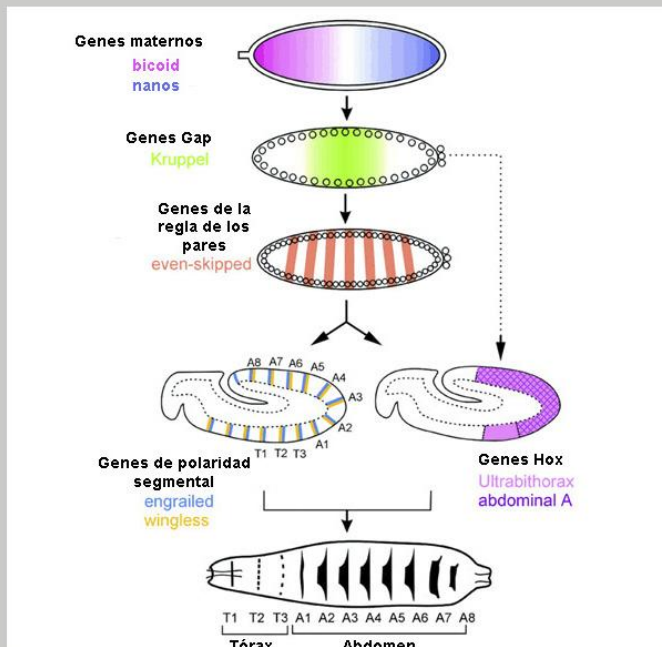


Figura I-3. Cascada de regulación génica implicada en el establecimiento de la organización segmental de *Drosophila melanogaster*. Las proteínas codificadas por ARNs maternos activan la expresión de los genes cigóticos "gap" -como *Krüppel*- y "Pair Rule" -como *even-skipped*-. Éstos, a su vez, activan a los genes de polaridad segmental y todos ellos a los genes Hox, que tienen patrones discretos a lo largo del eje A-P. Modificado de Sanson, 2001.

En el momento de expresión de estos últimos, el embrión se celulariza y deja de ser un sincitio. Al mismo tiempo se establece una división fundamental, repetida a lo largo del eje A-P, mediante la cual las células de cada unidad metamérica se dividen en dos compartimentos, el anterior (A) y el posterior (P). Los compartimentos son unidades de linaje celular (policlones) que quedan definidos por la expresión mutuamente excluyente de los genes de polaridad segmental *en*, en P, y *cubitus interruptus* (*ci*), en A. Los compartimentos A y P se mantendrán durante todo el desarrollo y se observarán también en los discos imaginales y en los grupos de histoblastos de cada segmento abdominal. De esta manera, todas las células provenientes de las originales del compartimento A o P quedarán circunscritas a una región concreta del tejido, sin mezclarse con las de otro compartimento (García-Bellido y col, 1973; Morata y Lawrence, 1975; Lawrence y Morata, 1976; Kornberg y col., 1985; Eaton y Kornberg, 1990; Mann y Morata, 2000). Por tanto, los genes de polaridad segmental, establecen el patrón del parasegmento (definido anteriormente) y los límites del compartimento, que corresponden en el embrión al borde entre los dominios transcripcionales de *wg*, junto con *ci*, y *en*. Es decir, estos

genes están involucrados en el establecimiento del patrón y la polarización de los segmentos (Baker, 1987; Lessing y Nusse, 1998).

Sin embargo, esta subdivisión parasegmental morfológica es transitoria. En embriones tardíos podemos encontrar como los incipientes surcos parasegmentales desaparecen, formándose profundos surcos segmentales en el borde posterior de la expresión de *en* (Martínez-Arias y Lawrence, 1985; Sanson, 2001). A pesar de ello, los parasegmentos continuaran siendo las unidades monoméricas de funcionalidad genética en las que está dividida la mosca. De hecho, una vez activados los genes de polaridad segmental, y, muy tempranamente, mucho antes de que desaparezca esta subdivisión anatómica parasegmental, se va a inducir la activación de los genes homeóticos o **genes Hox**, responsables de conferir identidad a cada parasegmento. En el embrión y adulto, sin embargo, son los segmentos las unidades morfológicas evidentes, por lo que nos referiremos a ellos y no a parasegmentos, en este trabajo, aunque estos sean, en general, las unidades de expresión génica de los genes Hox.

5. Los genes Hox

Los genes homeóticos o Hox son un conjunto de genes que presentan un importante papel en la formación de las diferentes estructuras corporales especificando su identidad a lo largo del eje A-P en todos los animales bilaterales (García-Fernández, 2005; Pearson y col., 2005). Estos genes deben su nombre al fenómeno de homeosis, definido por Bateson a partir de las transformaciones morfológicas de una región corporal en otra, observadas en distintas especies, y que conllevan la adquisición de todas las características del tejido hacia el que se transforman: tamaño, patrón, presencia de apéndices, etc. (Bateson, 1894). Como característica común, los genes Hox incluyen una secuencia de 180 nucleótidos muy conservada a nivel evolutivo, la homeobox, que se traduce en un dominio de 60 aminoácidos que permite la unión específica de la proteína Hox al ADN (McGinnis y col., 1984; Scott y Weiner, 1984). Estas proteínas actúan, por tanto, como factores de transcripción, regulando la expresión de diferentes genes que determinan la morfología de diferentes estructuras. Los genes Hox presentan una expresión diferencial a lo largo del eje A-P del cuerpo, determinada inicialmente en *Drosophila* por los productos de los genes “gap”, genes de la regla de los pares y genes de polaridad segmental (White y Lehmann, 1986; Inham y col., 1988; Harding y col., 1989). Es la expresión diferencial de los genes Hox, por tanto, la que especifica las distintas estructuras corporales (Fig. I-4) (Hombria y Lovegrove, 2003; Rezsöházy y col., 2015).

Una de las características fundamentales de los genes homeóticos es que aparecen agrupados en complejos que muestran una propiedad particular llamada colinearidad espacial. Esta puede definirse como la correspondencia existente entre el orden de expresión de los genes en el eje A-P del animal y el orden que muestran en el cromosoma (Lewis, 1978; Duboule y Dollé, 1989; Graham y col., 1989); o dicho de otra manera, los genes del extremo 3' del complejo se expresan en la parte anterior del animal, mientras que los situados en el extremo 5' lo hacen en la parte más posterior del mismo. Existe además, en vertebrados, una colinearidad temporal: los genes de un extremo del complejo (extremo 3') se activan en primer lugar y la expresión del resto de los genes del complejo continúa progresivamente a lo largo del mismo hasta los genes del extremo opuesto (5'), los últimos en expresarse (Fig. I-4) (Dollé y col., 1989; Duboule y Morata, 1994). En vertebrados se encuentra también una expresión colinear de dos complejos Hox en un eje secundario, el de los apéndices (Dollé y col., 1989).

Este agrupamiento descrito en complejos se da en prácticamente todas las especies en las que han sido identificados estos genes (Duboule, 2007). Así, por ejemplo, en la mayoría de los vertebrados, como el ratón o el ser humano, los genes Hox se encuentran formando un

complejo que está repetido en cuatro copias (aunque no todos los genes están igualmente repetidos) (Krumlauf, 1994), y en peces teleósteos hasta siete (Amores y col., 1998; Woltering y Durston, 2006). En el caso de *Drosophila melanogaster*, sin embargo, estos genes se encuentran agrupados en dos complejos génicos: el Complejo Antennapedia (C-ANT), que incluye, por orden en el cromosoma, de proximal a distal, los genes *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Antp*), y el Complejo Bithorax (C-BX), que incluye a *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Fig. I-4) (Lewis, 1978; Kaufman y col., 1980; Sánchez-Herrero y col., 1985; Tiong y col., 1985; Kaufman y col., 1990).

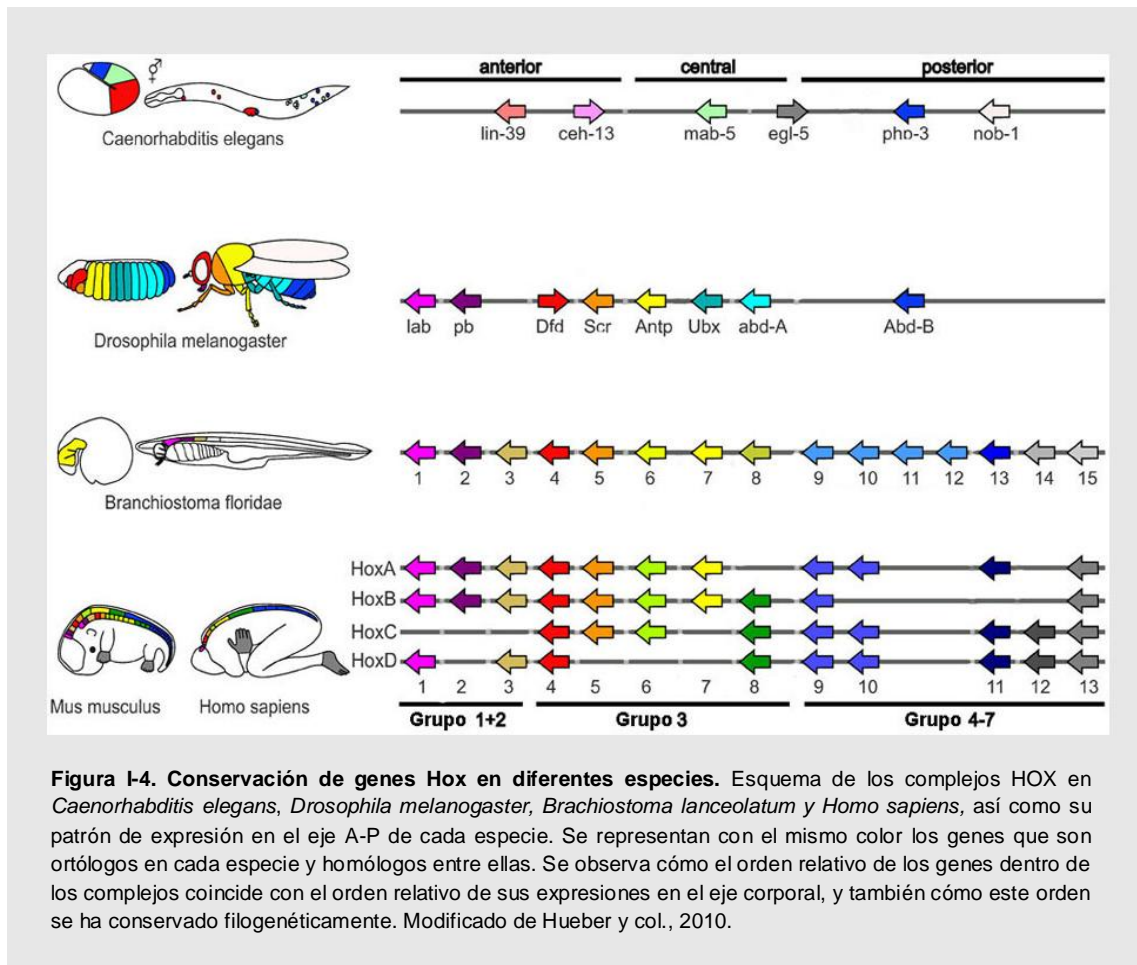


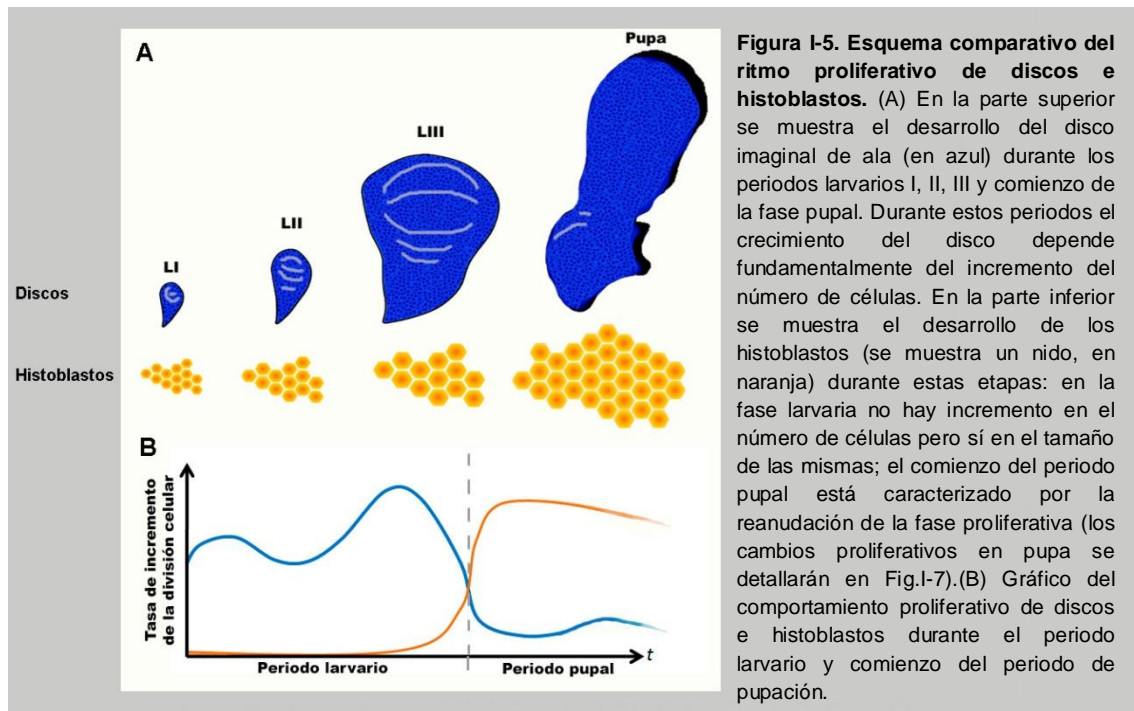
Figura I-4. Conservación de genes Hox en diferentes especies. Esquema de los complejos HOX en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Branchiostoma lanceolatum* y *Homo sapiens*, así como su patrón de expresión en el eje A-P de cada especie. Se representan con el mismo color los genes que son ortólogos en cada especie y homólogos entre ellas. Se observa cómo el orden relativo de los genes dentro de los complejos coincide con el orden relativo de sus expresiones en el eje corporal, y también cómo este orden se ha conservado filogenéticamente. Modificado de Hueber y col., 2010.

Otra característica fundamental de estos genes es que presentan una jerarquía transcripcional, siendo, en general, cada gen Hox regulado transcripcionalmente por aquellos cuyos patrones de expresión son posteriores al suyo en el eje A-P (Hafen y col., 1984; Struhl y White, 1985). Pero además, esta jerarquía de los genes Hox se da también entre las proteínas que codifican, es decir, los productos de genes Hox más posteriores siguen haciendo prevalecer su función sobre aquellos de expresión más anterior aún cuando la expresión de los genes que los codifican no esté reducida. Esto podría ser debido a una inactivación selectiva de unos productos por otros, o a las distintas afinidades de los productos por los mismos genes diana o por cofactores, por los que competirían de forma diferencial (González-Reyes y Morata, 1990; González-Reyes y col., 1990; Duboule, 1991; Duboule y Morata, 1994; Noro y col., 2011).

Las mutaciones en genes homeóticos producen en varios casos anomalías o defectos en desarrollo, pero en los más significativos, como se señaló anteriormente, causan la transformación de una estructura en otra. En *Drosophila*, por ejemplo, mutaciones en el gen *Ubx* transforman el tercer segmento torácico en el segundo, incluyendo la conversión de halterios (pequeños apéndices dorsales que funcionan como órganos de equilibrio en vuelo) en alas (Lewis, 1963). Tales transformaciones requieren cambios importantes en el número y propiedades de las células (ritmo de división celular, afinidades, diferenciación, etc.) y se deben, frecuentemente, a variaciones en la regulación de vías de señalización a diferentes niveles (Weatherbee y col., 1999). Centrandonos como ejemplo en los discos imaginales y el gen *Ubx*, en el que se han realizado un gran número de estudios, se ha demostrado que su actividad regula, entre otros parámetros, el crecimiento del disco de halterio en larva (Crickmore y Mann, 2006; de Navas y col., 2006; Makhijani y col., 2007), el tamaño celular en pupa (Roch y Akam, 2000) y la especificación de distintas rutas de señalización (Weatherbee y col., 1999; Shashidhara y col., 1999; Sánchez-Herrero, 2013). Los genes Hox, por tanto, deben regular muchos genes responsables de distintas funciones celulares para dar lugar al patrón de tipo silvestre (Choo y Russell, 2011; Sánchez-Herrero, 2013; Rezsöházy y col., 2015). La búsqueda de genes regulados por los genes Hox se ha realizado por diversas técnicas genéticas y moleculares (Hueber y Lohmann, 2008; Choo y Russell, 2011; Sánchez-Herrero, 2013), y más recientemente mediante experimentos de inmuno-precipitación de cromatina (Choo y col., 2011; Slattery y col., 2011; Agrawal y col., 2011; Donaldson y col., 2012; Shlyueva y col., 2016). Se han identificado así cientos o miles de genes que pueden estar regulados por los genes Hox. Sin embargo, la arquitectura genética definida por genes Hox que determina la formación de distintos órganos se conoce sólo en algunos casos específicos, como la formación de espiráculos posteriores (Castelli-Gair y col., 2009) o de glándulas salivares (Maruyama y Andrew, 2012), ambos en *Drosophila*. Nosotros hemos centrado nuestro trabajo en estudiar si los genes Hox pudieran regular el distinto crecimiento y patrón en discos imaginales e histoblastos.

6. Discos e histoblastos: establecimiento del patrón y crecimiento

Como ya se especificaba anteriormente, *Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo, que realiza una metamorfosis completa. La mayor parte de estructuras presentes en los estadios larvarios degeneran para ser reemplazadas por las nuevas estructuras formadas a partir de las células imaginales presentes ya en el embrión. Estas células imaginales, precursoras de los tejidos adultos, se encuentran formando dos tipos de estructuras: los discos imaginales y los nidos de histoblastos, singularizados ambos en el embrión por la expresión de genes como *escargot* (Hartenstein y Jan, 1992; Whiteley, 1992). Para que pueda darse una sincronización en el crecimiento de los tejidos con las señales hormonales que inducen metamorfosis y diferenciación, es necesario un estricto control de la proliferación tanto en discos imaginales como en nidos de histoblastos.



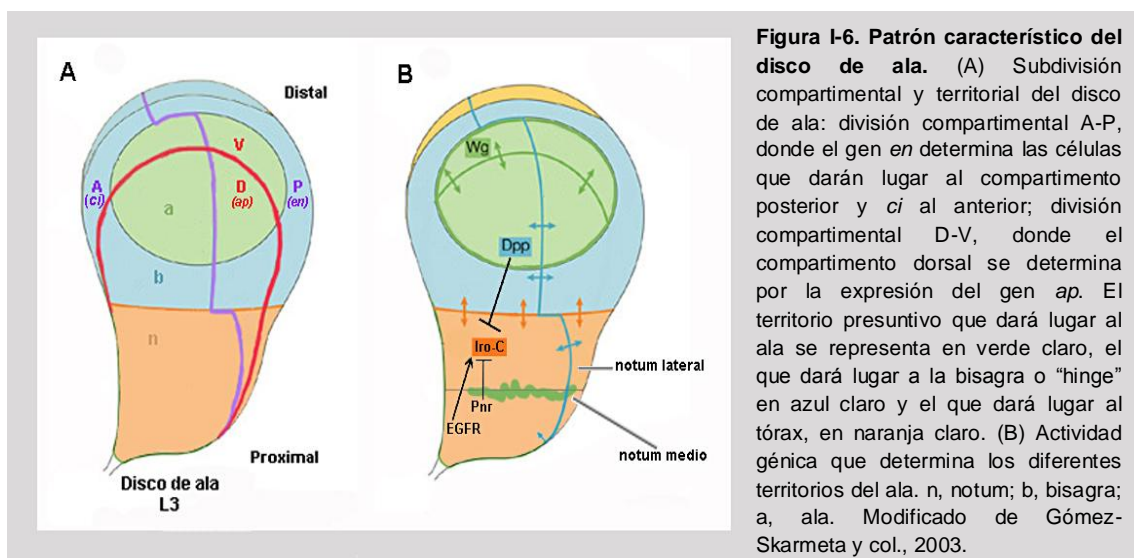
6.1 Discos imaginales

En la larva de *Drosophila* podemos encontrar en total nueve pares de discos imaginales, junto con un único disco impar, el disco genital (Fig. I-2). Estas estructuras están definidas ya a las 10h del desarrollo embrionario (estadio 13). Al final del periodo embrionario cada disco imaginal consta de 10 a 40 células, que sufren una parada en G1 entre la mitosis 16 a 18, al igual que las células epidérmicas larvarias (CELs) (Madhavan y Schneiderman, 1977; Bate y Martínez-Arias, 1991; Foe y col., 1993). Sin embargo, las CELs nunca vuelven a entrar en mitosis sino que sufren endoreplicación, lo cual conduce a la adquisición de su condición politécnica. El momento en el cual los discos vuelven a entrar en fase proliferativa ocurre tras el periodo embrionario y está estrechamente regulado, variando este momento en diferentes primordios imaginales. Por ejemplo, la primera división del disco de ojo tras la parada en G1 comienza a las 13-15 horas después de la eversión de la larva, en primer estadio larvario (L1), y va seguida de la de los discos de ala (15-17h) y halterio (18-20h); la región que formará la antena del disco imaginal de ojo-antena, los discos de pata y genital vuelven a entrar en división en L2 (24-26h tras la eversión de la larva). Finalmente, los discos labial y protorácico reinician el ciclo celular en L3 temprana (52-54h tras la eversión de la larva) (Madhavan y Schneiderman, 1977).

Por tanto, durante el desarrollo larvario los discos imaginales proliferan activamente hasta alcanzar un número de células unas 1000 veces superior al presente en el embrión, al menos en el disco de ala (Madhavan and Schneiderman, 1977; Cohen, 1993; Cohen y col., 1993; Weigmann y col., 1997; Su y O'Farrell, 1998; Potter y Xu, 2001; Martín y col., 2009), proceso a lo largo del cual van adquiriendo una expresión génica diferencial. Al final de la etapa larvaria, en los discos imaginales ya se encuentra establecida la mayor parte de los elementos de patrón morfológico que se observan en la cutícula adulta (Bryant, 1975). Durante el periodo pupal, sin embargo, se ha descrito que el disco imaginal de ala, el mejor estudiado, experimenta solo dos divisiones (Weigmann y col., 1997; O'Keefe y col., 2012; Guo y col., 2016).

Por otra parte, el crecimiento en el caso de los discos imaginales, como en la mayoría de tejidos y órganos, se encuentra estrechamente relacionado con la formación del patrón

característico de cada estructura. Así, por ejemplo, en el caso del disco imaginal de ala, el patrón de expresión génica que determinará el desarrollo de las estructuras derivadas del mismo se va definiendo acompasado con su crecimiento. En el disco maduro se distinguen tres regiones, con estructura genética diferenciada: el “pouch” o bolsa, que dará lugar al ala, la zona presuntiva de notum, que formará el mesotórax dorsal, y el “hinge” o bisagra, que une las dos estructuras. El desarrollo del disco comienza por el establecimiento de los compartimentos A-P (en el embrión), y D-V (al comienzo del segundo periodo larvario), anteriormente mencionados (García-Bellido, 1975; Morata y Lawrence, 1977; Mann y Morata, 2000). El gen selector *en* se expresa exclusivamente en los compartimentos posteriores y *ci* en los anteriores (Kornberg y col., 1985; Eaton y Kornberg, 1990), mientras que el gen *apterous* (*ap*) se expresa en el grupo de células que formarán el compartimento dorsal y determina la segregación D-V desde el segundo estadio larvario (Fig. I-6 A) (García-Bellido y col., 1976; Cohen y col., 1992; Díaz-Benjumea y Cohen, 1993; Blair, 1995). Casi al mismo tiempo aparece la tercera subdivisión de territorios mediada por la vía de señalización de EGFR (“Epidermal growth factor receptor”), que activa la expresión de los genes del complejo *Iroquois* (C-Iro), necesarios para el establecimiento de identidad de la región presuntiva del notum (Fig. I-6 B) (Simcox, 1997; Wang y col., 2000; Díez del Corral y col., 1999; Zecca y Struhl, 2002; Letizia y col., 2007). Esta tercera subdivisión, a diferencia de las anteriores, y aunque no menos importante, no conlleva una restricción de linaje estricta, como en el caso de los compartimentos, aunque sí existe una tendencia de los clones a segregarse en las dos diferentes regiones (Zirin y Mann, 2007). No obstante, estas diferencias en cuanto a regulación génica propias de cada territorio del disco de ala, son esenciales para el correcto desarrollo de los órganos a los que dará lugar (Díez del Corral y col., 1999; Mann y Morata, 2000).



A esta última subdivisión del disco en territorios, contribuye la expresión del gen de polaridad segmental *wg*, el cual restringe la actividad de la vía EGFR a la región proximal, donde parece ser requerido continuamente para determinar el destino notum frente al de ala (Wang y col., 2000; Zecca y Struhl, 2002). La zona presuntiva del notum queda definida en el disco maduro por la expresión del gen *pannier* (*pnr*) en la parte proximal del disco, y que determina la zona central del notum (García-García y col., 1999; Calleja y col., 2000), e *iroquois*, que formará las zonas laterales del mismo (Díez del Corral y col., 1999). En el eje A-P, *eyegone* (*eyg*) define la región anterior del notum restringiendo anteriormente la expresión posterior de *homothorax* (*hth*) en este territorio (Aldaz y col., 2005). En el caso del “hinge”, las células vienen definidas

por la expresión de *hth* y *teashirt* (*tsh*) (Azpiazu y Morata, 2000; Casares y Mann, 2000), mientras que el territorio de ala, en cambio, se define por la actividad de Wg en el segundo estadio larvario (Couso y col., 1993; Ng y col., 1996). Otros genes que se expresan más tardíamente, como *nubbin* (*nub*), *vestigial* (*vg*) y *scalloped* (*sd*) (Williams y col., 1993; Ng y col., 1996), promueven la formación del tejido de ala y su organización próximo-distal (Williams y col., 1993; Ng y col., 1995; Ng y col., 1996; Kim y col., 1996; Cifuentes y García-Bellido, 1997; Baena-López y García-Bellido, 2003; Zecca y Struhl, 2007).

La mayoría de estudios sobre el crecimiento y la formación de patrón se han realizado en el disco imaginal de ala y, dentro de él, en la región que formará el apéndice del ala (el “pouch”). En esta región el compartimento P expresa *hh*, bajo el control de *en*, y la proteína Hh, un morfógeno de corto alcance, se extiende al compartimento A activando, entre otros genes, la expresión de *decapentaplegic* (*dpp*) en una banda de células anteriores inmediatamente adyacente al borde de compartimento A-P (Fig. 1-6 B). Sólo las células del compartimento anterior son capaces de responder a esta señal, ya que En impide tal respuesta en las células del compartimento P (Basler y Struhl, 1994; Tabata y Kornberg, 1994; Zecca y col., 1995). *dpp* codifica un producto perteneciente a la familia de factores BMP-“Bone Morphogenetic proteins”- de la superfamilia de factores TGF- β y actúa como un morfógeno de largo alcance activando, según su distinta actividad, diferentes genes como *spalt* (*sal*), *optomotor-blind* (*omb*) y *vestigial* (*vg*) y reprimiendo la expresión de genes como *brinker* (*brk*), a su vez un antagonista de la actividad de Dpp (Spencer y col., 1982; Zecca y col., 1995; de Celis y col., 1996; Campbell y Tomlinson, 1999; Jazwinska y col., 1999; Minami y col., 1999; Sivasankaran y col., 2000; Restrepo y col., 2014; Beira y Paro, 2016). Así, Dpp controla crecimiento y patrón en la zona presuntiva del ala (Capdevilla y Guerrero, 1994; Burke y Basler, 1996; Lecuit y col., 1996; Nellen y col., 1996; Restrepo y col., 2014; Akiyama y Gibson, 2015). Por otra parte, Wg se requiere asimismo para determinar el patrón y crecimiento en el “pouch” del disco de ala, pero su papel como morfógeno no está aclarado (Neumann y Cohen, 1997; Strigini y Cohen, 2000; Alexandre y col., 2014).

dpp se expresa igualmente en la región del borde A/P en la zona presuntiva de notum, y *wg* en una banda en la parte central del mismo. Sin embargo, ni *dpp* ni *wg* parecen tener una función en el crecimiento de esta región, sino más bien, al menos en el caso de *wg*, en la especificación de una parte del tejido que incluye las quetas dorso-centrales (Phillips y Whittle, 1993; Tomoyasu y col., 1998).

Diversos trabajos realizados en la zona del “pouch” han implicado una coordinación entre la formación de patrón y el crecimiento, donde se ha descrito que morfógenos como *wg* o *dpp* están implicados en la regulación de ambos procesos y, por tanto, en su coordinación (Capdevilla y Guerrero, 1994; Burke y Basler, 1996; Neumann y Cohen, 1996; Restrepo y col., 2014; Akiyama y Gibson, 2015). Pero además de la función de estos morfógenos en determinar los mecanismos de crecimiento existen otras vías de señalización implicadas en este proceso, como son las vías de Hippo o de la Insulina, cuya actividad modifica el tamaño celular (aumento de masa de las células) (Hietakangas y Cohen, 2009) o el ciclo celular (Edgar y Kim, 2009). La vía de Hippo se ha relacionado con la de Dpp (Rogulja y col., 2008; Oh e Irvine, 2011; Baena-López y col., 2012) sugiriendo una actuación coordinada en el crecimiento. Sin embargo, prácticamente todos los trabajos que estudian el crecimiento en discos imaginales, como el de ala, se han centrado en el apéndice, siendo escasa o inexistente la información sobre cómo afectan a la zona presuntiva de notum.

6.2 Nidos de histoblastos

Los histoblastos se especifican durante los estadios embrionarios como pequeños grupos de células organizados en nidos, como mencionábamos anteriormente. Cada segmento del abdomen adulto se forma a partir de 4 pares de nidos de histoblastos: el par anterior dorsal se corresponde con el compartimento anterior, que dará lugar a los terguitos, piezas cuticulares dorsales del abdomen, el posterior dorsal se corresponde con el compartimento posterior y da lugar a la membrana intersegmental y el acroterguito, parte anterior del segmento siguiente posterior, el par ventral dará lugar a los esternitos y las pleuras, y el par espiracular dará lugar al espiráculo (Fig. I-7A). Cada nido anterior dorsal o ventral está compuesto, al comenzar el periodo larvario, por aproximadamente 11-16 células, cada nido ventral por 10-14 células, cada nido posterior consta de unas 5-8 células y cada espiracular de 3 (Madhavan y Schneiderman, 1977; Madhavan y Madhavan, 1980; Kopp y col., 1999; Ninov y col., 2007).

Los histoblastos detienen la división celular en fase G2 al final del periodo embrionario, a diferencia de las células de los discos, que como dijimos se encuentran detenidas en fase G1 (Madhavan y Schneiderman, 1977; Bate y Martínez-Arias, 1991; Foe y col., 1993). Estas células abdominales permanecerán quiescentes durante los estadios larvarios (Fig. I-5; Fig. I-7 B) pero van a proliferar activamente durante la pupación (Fig. I-5; Fig. I-7 C, D), reemplazando por completo a la epidermis larvaria en el proceso de histólisis de las CELs (Madhavan and Schneiderman, 1977; Madhavan y Madhavan, 1980; Ninov y col., 2007, Ninov y col., 2009). Durante la etapa larvaria se produce un incremento de la masa celular por activación de la vía de la PI3K (Fig. I-5; Fig. I-7B). Al final de esta etapa, los histoblastos habrán acumulado además grandes reservas de la proteína Ciclina-E (CycE), indispensables para la entrada en la fase proliferativa (Fig. I-7B). La etapa proliferativa empieza nada más comenzar la pupación, inducida por la actividad de la ecdisona, que experimenta un pico de expresión en ese momento, y que permite la activación del gen *string* (Ninov y col., 2009). El gen *string* codifica la proteína homóloga a la fosfatasa Cdc25 de levadura, y promueve la defosforilación de la Cyc-B unida a Cdc2, permitiendo así la entrada en mitosis (Russell y Nurse, 1986; Edgar y O'Farrell, 1989; Edgar y col., 1994). Esto ocurre, por tanto, entre las 1-3h después de la formación del pupario (3h DFP) (Roseland y Schneiderman, 1979; Ninov y col., 2009). En las primeras 8h de desarrollo pupal los histoblastos se dividen rápidamente de forma sincrónica (3 divisiones) sin que haya crecimiento celular, por lo que las células son cada vez más pequeñas (Fig. I-5; Fig. I-7 C). Este proceso se encuentra asociado a un acortamiento de la fase G1. Entre las 15-36h DFP se produce una segunda ronda de proliferación con divisiones más lentas, en las que se pierde la sincronía. Durante esta fase, cuyo comienzo depende de la activación de la vía EGFR, se produce un alargamiento de la fase G1 y gracias a la activación de la vía de la PI3K estas células crecerán entre división y división manteniendo así su tamaño (Fig. I-7 D) (Ninov y col., 2007; Ninov y col., 2009). Durante ese periodo los histoblastos se expanden y reemplazan a las CELs, que mueren y sufren extrusión basal. Durante el proceso, las células del borde de los nidos de histoblastos experimentan una reducción en la expresión de los marcadores de uniones adherentes y emiten filipodios apicales y basales y lamelipodios que se expanden sobre la superficie de las CELs permitiendo así la expansión de los nidos (Ninov y col., 2007; Bischoff y col., 2012).

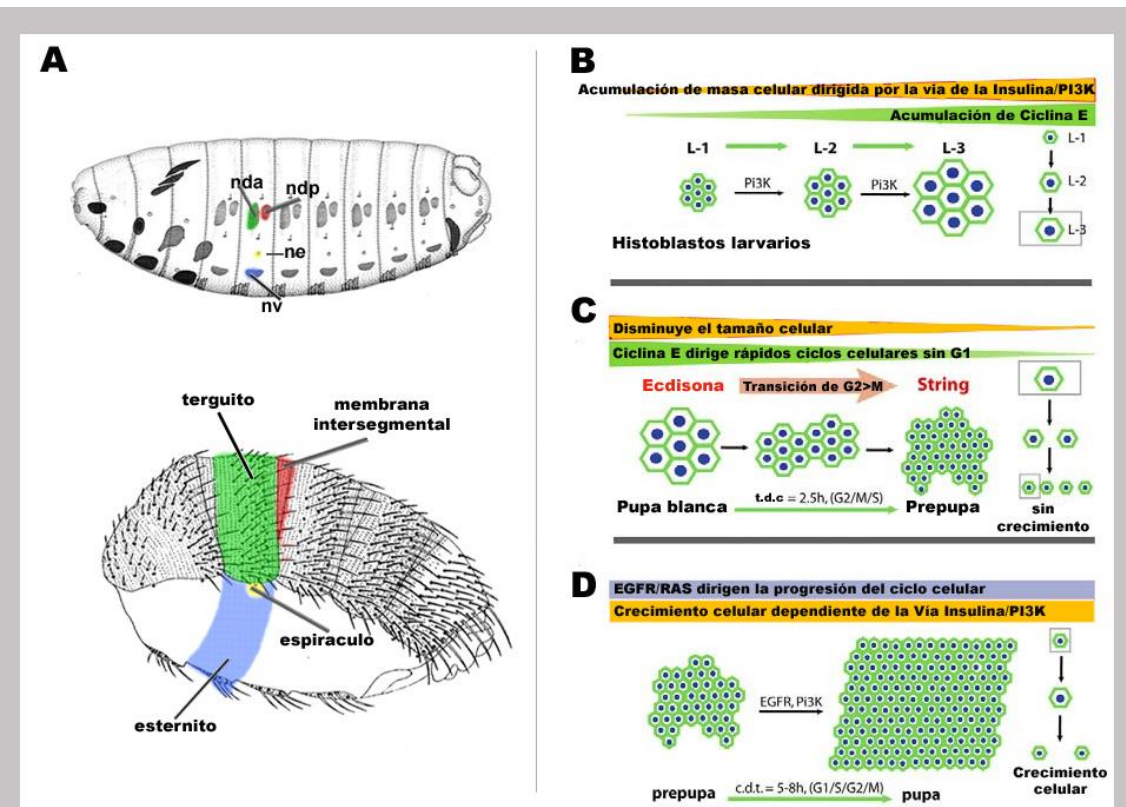


Figura I-7. Esquema del desarrollo de los histoblastos. (A) En la parte superior de la figura se muestran los 4 nidos de histoblastos presentes por hemisegmento en el embrión (coloreados de acuerdo con las estructuras cuticulares a las que darán lugar en el adulto, representado en la parte inferior de la figura): nda, nido dorsal anterior (verde); ndp, nido dorsal posterior (rojo); ne, nido espiracular (amarillo); nv, nido ventral (azul). (B-D) Esquema del comportamiento proliferativo de los histoblastos durante las fases larvarias (B) y la pupación (C, D). (B) Durante el periodo larvario los histoblastos no sufren divisiones. Sin embargo, el tamaño de las células se mantiene como consecuencia de la activación de la vía de la PI3K. (C) La primera fase de la pupación (0-8h DFP) se caracteriza por la entrada en división. Esta fase es dependiente del pico de expresión de la hormona ecdisona al comienzo de la pupación, que provoca la activación de la fosfatasa *string* necesaria para la entrada en mitosis. Estas divisiones son rápidas, sincrónicas y sin crecimiento celular. (D) La segunda fase proliferativa en pupación es dependiente de la actividad de la vía de EGFR. Estas divisiones se caracterizan por ser más lentas, asincrónicas, y con mantenimiento del tamaño celular debido a la activación de la vía de la PI3K. Modificado de Ninov y col., 2009.

El patrón cuticular abdominal se establece en los primeros dos días del desarrollo pupal, donde tienen lugar la proliferación y migración de los histoblastos y la destrucción de las CELs. Durante este periodo existe una evolución de la expresión de los genes *en*, *hh*, *patched* (*ptc*) y *omb* (Struhl y col., 1997a,b; Kopp y Duncan, 1997; Lawrence y col., 1999), de forma similar en los nidos dorsales y ventrales. En el compartimento posterior encontramos la expresión de *en* y *hh* (inducido por *en*) que se expresan gradualmente desde la zona más anterior del compartimento posterior. La expresión de Hh se extiende por el compartimento A definiendo patrón y polaridad, y es transmitida por su receptor Patched (Ptc) (Lawrence y col., 1999; Murone y col., 1999; Bischoff y col., 2013; Ingham, 2016), que se detecta en el nido dorsal anterior poco antes de la fusión con el nido dorsal posterior es decir, cuando se forma un segmento (Bischoff y col., 2013). Una vez Hh se une a Ptc se activan los genes *wg* y *dpp* en dominios excluyentes. La expresión de *wg* promueve la identidad de terguito y de esternito, mientras que la de *dpp* da identidad de pleura (Shirras y Couso, 1996; Kopp y col., 1999; Lawrence y col., 2002). Es decir, la actividad de *wg* y *dpp* en el abdomen se asocia con adquisición de identidad, no con crecimiento, como ocurre en la parte distal de los discos imaginales torácicos. Hh también provoca la activación en la región posterior del terguito de *omb*, que se requiere para el desarrollo de esta parte del segmento, incluyendo la producción

de su característica banda de pigmentación oscura (Kopp y col., 1997; Kopp y col., 1999; Lawrence y col., 2002; Ninov y col., 2009).

Cuando los segmentos empiezan a fusionarse (30-42h DPF) se pierden las CELs situadas en el borde posterior de cada segmento ("border cells"), que son las últimas en extruirse (Madhavan y Madhavan, 1980; Kopp y col., 1997; Koop y Duncan, 2002; Ninov y col., 2007). Se ha descrito que estas últimas CELs impedirían a las células del nido anterior de un determinado segmento recibir la señalización de la proteína Hh, secretada por las células del nido posterior del segmento inmediatamente anterior (Kopp y Duncan, 1997; Struhl y col., 1997 a,b; Kopp y Duncan, 2002; Bischoff y col., 2013).

Este esquema general de desarrollo es común a los distintos segmentos abdominales. Algunos de estos (A5-A7), sin embargo, presentan una morfología diferente en machos y hembras, debido a la diferente actividad de la ruta de determinación sexual en conjunción con *Abd-B* (Kopp y col., 2000; Wang y col., 2011; Wang y Yoder, 2012; Foronda y col., 2012); dentro del mismo sexo también hay cambios de morfología en estos segmentos debidos a los genes Hox (Wang y Yoder, 2012; Foronda y col., 2012).

7. Genes Hox y desarrollo del abdomen en *Drosophila*

Como ya mencionábamos anteriormente, la expresión de los genes Hox es la responsable de las características específicas de los diferentes segmentos corporales a lo largo del eje A-P. En el caso del abdomen, los genes Hox que especifican la identidad de los diferentes segmentos, son los genes del C-BX. En realidad, el C-BX es responsable de la identidad segmental del la parte posterior del segundo segmento torácico (T2p), el T3 (en el tórax) y de los ocho segmentos abdominales (A1-A8) (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero y col., 1985; Tiong y col., 1985). *Ubx* se expresa en T2p-A8 en el embrión (White y Wilcox, 1985; Beachy y col., 1985) y, en la larva, en los discos imaginales del T2p, T3 (halterio y pata III) así como en los histoblastos del A1 (White y Wilcox 1984; 1985a, b; Beachy y col., 1985). En ausencia de *Ubx*, y en relación a su función en derivados de discos imaginales, el metatórax se convierte en mesotórax, o segundo segmento torácico (T2) (Hay también una función temprana de *Ubx* en T2p, que no consideramos aquí; Kerridge y Morata, 1981; Casanova y col., 1985). Esta transformación afecta a las patas, a los halterios (que se convierten en alas) y al metanotum, pequeña tira de cutícula que une los halterios, en mesonotum, la zona dorsal del notum, mucho más grande y con macro y micro-quetas. Esta es la estructura mesotorácica que en condiciones silvestres (en el propio mesotórax) proviene de la zona presuntiva del notum del disco imaginal de ala. En cuanto a su función en nidos de histoblastos, la ausencia de *Ubx* produce la ausencia del primer segmento abdominal (A1) (Lewis, 1963; Lewis, 1978; Frayne y Sato, 1991).

El siguiente gen del complejo es *abd-A*, que se expresa en A1p-A8 en el embrión (Karch y col., 1990; Macías y col., 1990) y en el mismo dominio de nidos de histoblastos y CELs en la larva, y cuya expresión incrementa hacia los segmentos posteriores, llegando a niveles máximos en el A6 (Kopp y Duncan, 2002). Este gen especifica los segmentos A2-A4, y contribuye a la formación de los segmentos A5-A7 (Sánchez-Herrero y col., 1985; Tiong y col., 1985; Karch y col., 1985). En el segmento A7 *abd-A* se expresa de forma reducida debido a su represión por *Abd-B* (Karch y col., 1990; Macías y col., 1990; Singh y Mishra, 2014). En las mutaciones *abd-A* se producen transformaciones de A2-A4 hacia A1, debido a la desrepresión de *Ubx* (Sánchez-Herrero y col., 1985; Tiong y col., 1985; Struhl y White, 1985), mientras que en el A5-A7 coopera con *Abd-B* y su falta provoca transformaciones con características cuticulares intermedias entre A1 y segmentos posteriores (Sánchez-Herrero y col., 1985; Tiong y col.,

1985; Karch y col., 1985). Finalmente, *Abd-B* se expresa en el dominio A4p-A9 en el embrión (Celniker y col., 1989; de Lorenzi y Blenz, 1990) y se requiere para formar los últimos segmentos abdominales y la genitalia. En mutantes *Abd-B* los segmentos A5-A8 del abdomen se transforman hacia A4 (Sánchez-Herrero y col., 1985; Tjong y col., 1985; Karch y col., 1985; Casanova y col., 1986). La falta de los tres genes del complejo provoca una transformación de todos los segmentos hacia T2 observable en el embrión, ya que los individuos no llegan al estado adulto (Lewis, 1978; Casanova y col., 1987).

Mientras que *abd-A* es un gen requerido solo para desarrollar el abdomen, el gen *Ubx* se requiere tanto para el desarrollo de estructuras provenientes de discos imaginales, el tercer segmento torácico o metatórax, como de nidos de histoblastos (del A1). Mutaciones de ganancia de función de *abd-A*, como *Hyperabdominal* (Lewis, 1981) o de *Abd-B*, como *Transabdominal* (Celniker y Lewis, 1987) o *tumorous-head* (Kuhn y col., 1991), producen tejido de abdomen en derivados de discos imaginales (tórax o cabeza), pero no se conoce en estos casos el momento de la transformación, el ritmo de división de las células mutantes o cuando organizan su patrón. En mutantes *Ubx* el A1 se transforma en tórax en el embrión y un disco imaginal ventral ectópico aparece en este segmento (Frayne y Sato, 1991); en el adulto, en cambio, se observan transformaciones ventrales, ya que aparece un par de patas en este segmento (Lewis, 1963; Kerridge y col., 1982), pero no una transformación dorsal, ya que el terguito de A1 desaparece, mientras que clones mutantes para *Ubx* e inducidos en periodo larvario no sobreviven en la cutícula adulta (Morata y García-Bellido, 1976).

Encontramos, por tanto que: i) existe un diferente comportamiento proliferativo de discos imaginales e histoblastos, con diferente regulación génica, ii) la expresión ectópica de genes Hox pueden transformar células de discos imaginales en abdomen, aunque se desconocen los parámetros de estas transformaciones, y iii) la pérdida de un gen Hox en el abdomen causa la pérdida de las células mutantes. Esto plantea la pregunta de si, y cómo, los genes Hox pueden modificar las características de células de disco e histoblastos (incluyendo el ritmo de proliferación) durante etapas larvarias y pupales y cómo se acopla este posible efecto en división celular con la diferenciación. Por ello decidimos centrarnos en el estudio de los genes *Ubx* y *abd-A* como principales inductores de identidad abdominal y, posiblemente reguladores del comportamiento proliferativo de este tejido.

OBJETIVOS

- 1- Determinar la función de los genes Hox *Ultrabithorax* y *abdominal-A* de *Drosophila melanogaster* en el comportamiento proliferativo de los histoblastos.
- 2- Analizar el papel de los genes *Ultrabithorax* y *abdominal-A* en el proceso de diferenciación del tejido que especifican.
- 3- Estudiar la función de los genes *Ultrabithorax* y *abdominal-A* en el desarrollo de los nidos de histoblastos en diferentes estadios del desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas de moscas

La cepa silvestre utilizada en los casos en los que no se especifica genotipo fue en todos los casos la cepa Vallecas.

1.1 Líneas Gal4

Mediante el sistema binario de expresión transcripcional de levaduras Gal4/UAS implementado en *Drosophila* se puede expresar un gen (ADNc) que, bajo el control de las secuencias activadoras UAS, se active sólo en el lugar y el momento en que se produzca la proteína Gal4; la expresión del gen que la codifica está dirigida por secuencias reguladoras que varían en cada línea de moscas (Brand y Perrimon, 1993).

Las líneas Gal4 utilizadas son:

- *pannier*-Gal4 (*pnr*-Gal4) (Calleja y col., 2000). Dirige la expresión en el dominio longitudinal dorsal que se extiende a lo largo de los segmentos cefálicos, torácicos y abdominales, es decir, en la región dorsal central del eje corporal de *Drosophila*. En el disco de ala, dirige la expresión en parte del dominio presuntivo del notum.

- *apterous*-Gal4 (*ap*-Gal4) (Calleja y col., 1996). Dirige la expresión en la región dorsal del disco de ala y halterio y en un anillo del disco imaginal de pata III correspondiente al tarso 4 y al pliegue entre los segmentos tarsales 4 y 5.

- *MS248*-Gal4 (Sánchez y col., 1997). Se expresa en el notum presuntivo del disco de ala, algunas células del borde dorso-ventral y, a partir del estadio pupal, en algunas células larvarias e histoblastos dorsales,

- *Eip71CD*-Gal4 (Cherbas y col, 2003). Se expresa en las células epidérmicas larvarias (CELs).

- *escargot*-Gal4 (*esg*-Gal4) (Goto y Hayashi, 1999). Se ha descrito como un marcador de células diploides. Tiene expresión en discos imaginales e histoblastos. Nosotros lo hemos usado como línea para el estudio de histoblastos. Sin embargo, en este tejido, su expresión decae durante los últimos estadios pupales (Ninov y col., 2007). Por ello, para algunos de los experimentos en abdomen hemos recurrido a la combinación del “cassette” *act-FRT-y⁺-FRT*-Gal4 UAS-GFP; UAS-FLP (Ito y col., 1997) en combinación con *esg*-Gal4, para mantener la expresión de la proteína Gal4 en todo el periodo pupal (combinación usada en Ninov y col., 2007) (El sistema FLP/FRT se describe en el apartado 3.1a de Material y Métodos). En esta combinación, *esg*-Gal4 promueve la expresión de UAS-FLP induciendo la recombinación en *cis* de las secuencias FRT y dando lugar a un evento de “FLP-out” en las células que expresan Gal4. El resultado es que el Gal4 del “cassette” queda bajo el control del promotor de *actina* tras la recombinación entre secuencias FRT, induciendo así la expresión permanente de la proteína Gal4 (y, por tanto, de GFP) en todas las células que en algún momento hayan expresado *esg*. A esto es a lo que hemos denominado línea *escargot* permanente (*esg perm*), aunque hemos comprobado que su expresión decae al final del desarrollo pupal.

1.2 Líneas UAS

Se han usado las siguientes líneas: *UAS-abd-A²⁰⁻¹⁻¹* (Michelson, 1994), *UAS-Ubx^{SG1}* (Castelli-Gair y col., 1994), *UAS-p35* (Hay y col., 1994), *UAS-GFP* (Ito y col., 1997), *UAS-ubi-GFP-E2F1₁₋₂₃₀* y *UAS-ubi-mRFP1-CycB₁₋₂₆₆* (estas construcciones se designan como UAS-GFP-E2F y UAS-RFP-CycB en Resultados) del sistema FlyFucci (Zielke y col., 2014), y *UAS-lacZ* (Brand y Perrimon, 1993).

1.3 Líneas lacZ

Se han usado las siguientes líneas: *A101-lacZ* (Bellen y col., 1989; Huang et al., 1991), *CyO*, *wg-lacZ* (Kassis y col., 1992), *string-lacZ* (*stringb-E5.3III*) (Lehman y col., 1999).

1.4 Líneas ARNi

Para el silenciamiento genético se han usado las siguientes líneas de UAS-ARNi: UAS-*abd-A* ARNi 106155 (Vienna Drosophila Resource Center), UAS-dsARN>*Ubx* (Monier y col., 2005). Esta última se designa en Resultados también como UAS-*Ubx* ARNi.

1.5 Líneas mutantes

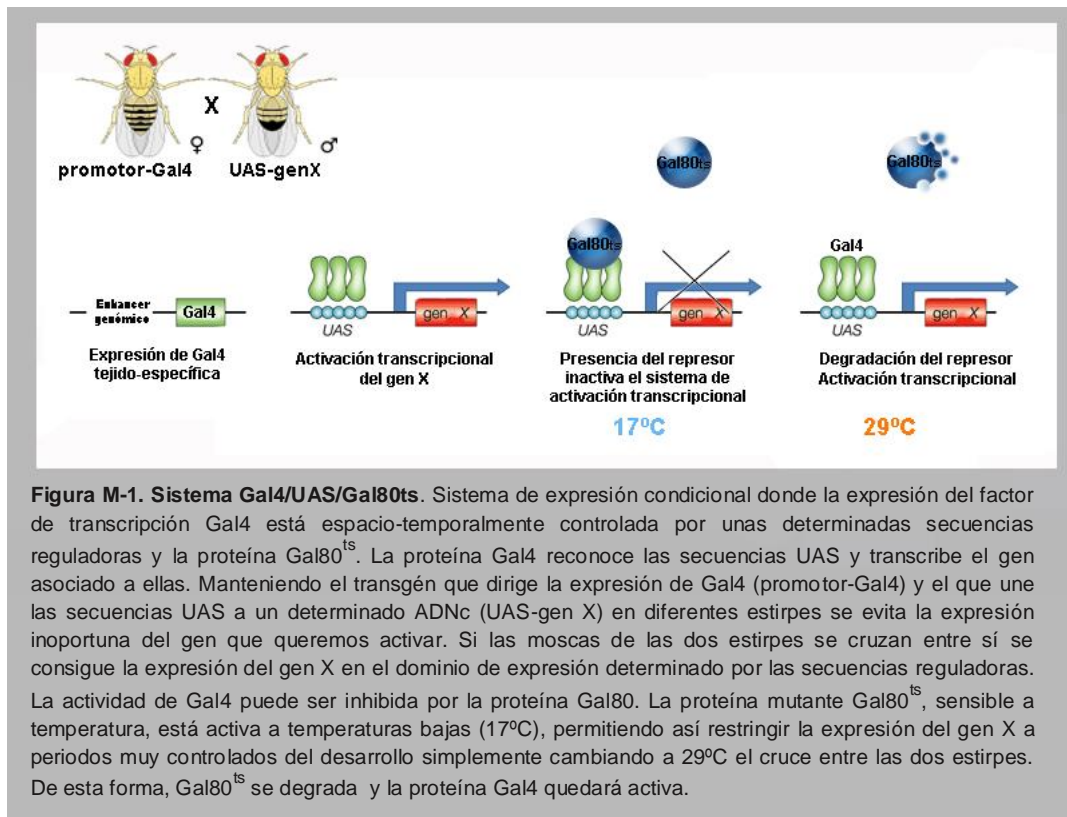
Las distintas líneas mutantes que se han usado han sido: *abd-A^{M1}* (Sánchez-Herrero y col., 1985), *Ubx^{6.28}* (Kerridge y Morata, 1982), *Ubx¹ abd-A^{D24} Abd-B^{D18}* (Hopmann y col., 1995) y la deficiencia *Df109* (*DfUbx¹⁰⁹*), que descubre los genes *abd-A* y *Ubx* (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero y col., 1985).

2. Experimentos de cambio de temperatura

La expresión ectópica temprana de *abd-A* dirigida por las líneas *pnr-Gal4* y *ap-Gal4* provocaba letalidad embrionaria. Los experimentos encaminados a describir la función de *abd-A* en las células presuntivas de notum del disco de ala fueron realizados por este motivo con el sistema Gal4-Gal80^{ts} para evitar esta letalidad. En estos experimentos, la proteína Gal80^{ts} está activa a la temperatura restrictiva de 17°C, impidiendo la expresión de la proteína Gal4, mientras que a 29°C la proteína Gal80^{ts} se degrada. Así, si el experimento (un determinado cruce, por ejemplo) se traslada a 29°C se permite la expresión de la proteína Gal4 (McGuire y col., 2003; Zeidler y col., 2004). La construcción *tub-Gal80^{ts}*, en la que la proteína está bajo el control del promotor del gen codificante para la *tubulina* (*tub*), permite producir Gal80^{ts} en todas las células del organismo, y su efecto tendrá lugar únicamente en las células donde se encuentre la proteína Gal4 (Fig. M1). Este sistema se usó además en los experimentos de falta de función de los genes *Ubx* y *abd-A*, mediante el uso de sus ARNi, en histoblastos o epidermis larvaria, bajo el control de las líneas *esg-Gal4* y *Eip71CD-Gal4*, respectivamente.

También fue utilizado este sistema en los experimentos de determinación de la fase del desarrollo en la que *abd-A* es suficiente para promover un cambio de identidad hacia tejido abdominal mediante el uso de la línea *MS248-Gal4*, o un rescate de un fenotipo mutante en el abdomen con la línea *abd-A-Gal4*. Para tratar de ajustar lo más posible la activación o inactivación génica a los periodos de larva o pupa, según correspondiera, se tuvo en cuenta el posible retraso en la función debido al tiempo de activación/inactivación de la proteína Gal80^{ts} tras el cambio de temperatura (ver McGuire y col., 2003). De esta manera, para tratar de asegurar que la activación de la expresión en larva no se extendía hasta el periodo pupal, tras cambiar a 17°C las larvas que habían pasado todo el periodo larvario a 29°C (es decir, que estuvieron 4 días a 29°C tras pasar los 3 días previos del desarrollo embrionario a 17°C), sólo se seleccionaron las pupas blancas que encontrábamos tras 16h de desarrollo a esta temperatura restrictiva. Esas pupas blancas se dejaron durante el resto del desarrollo a temperatura restrictiva. Los adultos emergidos con este sistema son en los que consideramos que la expresión inducida de *abd-A* había tenido lugar únicamente durante el desarrollo larvario. De manera similar, para tratar de asegurar que la activación de la expresión de *abd-A* ocurría únicamente durante el periodo de pupa, decidimos mantener las pupas a 17°C hasta 6h antes de la formación del pupario (AFP). Es decir, tras pasar las larvas a 29°C se seleccionaron las pupas blancas tras 6h a esta temperatura. Esas pupas blancas se dejaron

durante el resto del desarrollo a esta temperatura permisiva. Los adultos emergidos son en los que consideramos que la expresión inducida de *abd-A* había tenido lugar únicamente durante el desarrollo pupal.



3. Análisis clonal

3.1 Clones de falta de función

Este procedimiento permite obtener clones de células mutantes homocigóticas (para una mutación, construcción, etc.) en un tejido heterocigótico en distintos estadios de desarrollo.

Para el estudio de clones mutantes recurrimos a dos sistemas de inducción de los mismos:

- La técnica de la recombinación mitótica mediada por FLP/FRT (Golic y Lindquist, 1989; Xu y Rubin, 1993). Con esta técnica, que utiliza elementos provenientes de levadura, la recombinación se produce entre secuencias FRT ("Flipase Recombination Target") en presencia de la enzima *flipasa* (*flp*), de forma que se pueden producir células homocigóticas para el brazo cromosómico en el que se encuentra la secuencia FRT; es decir, la recombinación se produce entre secuencias FRT localizadas en la misma posición de cromosomas homólogos, dándose una recombinación en *trans* durante la mitosis (Golic, 1991; Xu y Rubin, 1993) (Fig. M2). Tras la misma, en el 50% de los casos se producirá una segregación de cromátidas que dará lugar a una mutación homocigótica en una célula y sus descendientes. La construcción *hsFLP122*, que hemos utilizado en estos experimentos, se describe en Struhl y Basler, 1993; al estar la síntesis de flipasa controlada por un promotor dependiente de temperatura ("heat-shock", *hs*), la recombinasa sólo estará presente en el momento en que se proporcione un choque térmico, que será el momento elegido para inducir los clones. De esta manera, si una de las secuencias FRT está ligada en el mismo brazo cromosómico a una mutación de interés y la secuencia FRT

de su cromosoma homólogo lo está a un marcador celular, como podría ser la proteína GFP expresada bajo el control de un promotor ubicuo, podríamos obtener clones de células mutantes, marcadas por la ausencia de la expresión de GFP, en un tejido heterocigótico. De esta forma, por ejemplo, se puede estudiar el comportamiento celular de mutaciones letales zigóticas, ya que la mayoría de las mismas no son letales celulares (Ripoll y García-Bellido, 1973; Ripoll, 1977).

Los clones estudiados con este sistema se indujeron en larvas de los siguientes genotipos:

- *y w hsFLP122/+* (o Y); *FRT82B Ubi-GFP Ubx^{6.28}/FRT82B Ubi-RFP*
- *y w hsFLP122/+* (o Y); *FRT82B abd-A^{M1}/FRT82B M(3)w124 y+*
- *y w hsFLP122/+* (o Y); *FRT82B Ubx^{6.28}/FRT82B M(3)w124 y+*

M(3) hace referencia a la mutación para el gen *Minute*, que codifica para una proteína ribosomal. Aquellas células mutantes para este gen se encuentran en desventaja proliferativa (Morata y Ripoll, 1975).

Mediante este sistema indujimos clones mutantes para *abd-A^{M1}*, *Ubx^{6.28}* estimulando la expresión de la *flipasa 122* con un choque térmico de 30 minutos a 37°C 24h antes de la formación del pupario (AFP). Los clones fueron observados en tejido fijado a las 96h después de la formación de pupario (DFP) en el caso de pupas *y w hsFLP122/+*; *FRT82B Ubi-GFP Ubx^{6.28}/FRT82B Ubi-RFP*, donde los clones de interés estarán marcados en los abdómenes pupales por la expresión doble del marcador GFP y la ausencia de señal RFP. En el resto de casos los clones fueron observados en la cutícula adulta, donde los clones de interés se encuentran marcados por la ausencia del marcador cuticular *y*. La ausencia de este marcador genera quetas y cutícula de pigmentación más clara, lo que nos permite distinguir los clones en el adulto.

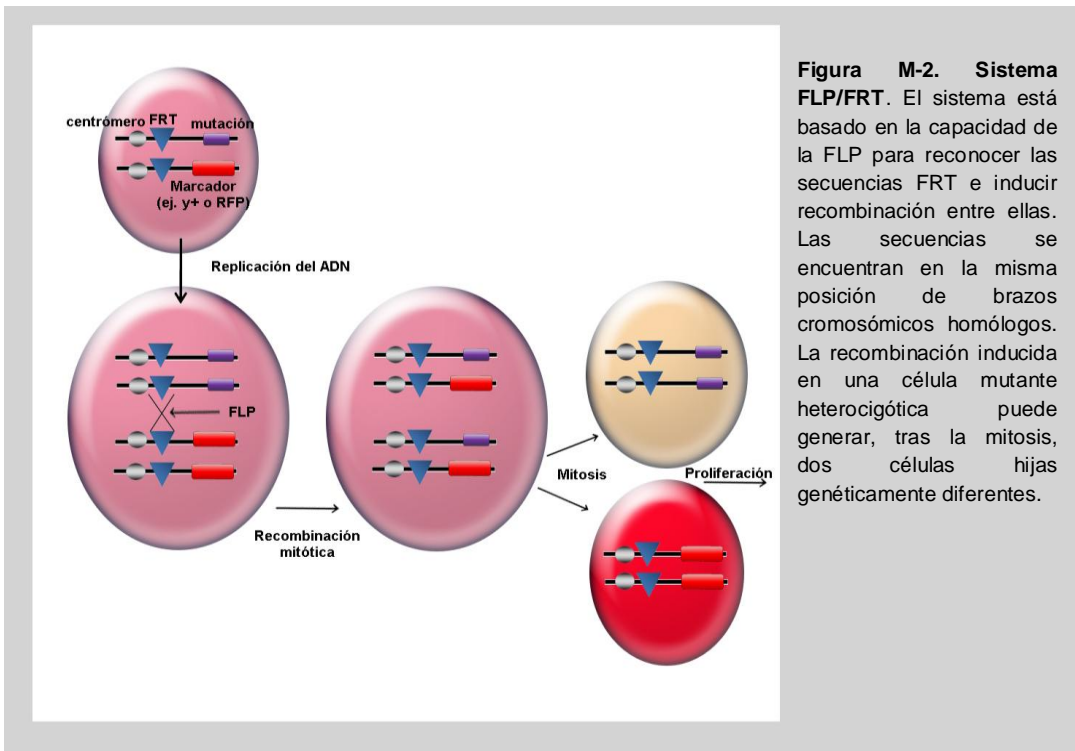


Figura M-2. Sistema FLP/FRT. El sistema está basado en la capacidad de la FLP para reconocer las secuencias FRT e inducir recombinación entre ellas. Las secuencias se encuentran en la misma posición de brazos cromosómicos homólogos. La recombinación inducida en una célula mutante heterocigótica puede generar, tras la mitosis, dos células hijas genéticamente diferentes.

b) Otra manera de estudiar la actividad génica en individuos mosaico es inducir clones de recombinación mitótica y utilizar la proteína Gal80, que impide la actividad de la proteína Gal4, ligada a una secuencia FRT en el mismo brazo cromosómico, en un sistema mixto FLP/FRT y Gal4/UAS, llamado también sistema MARCM (Lee y Luo, 1999) (Fig. M-3). En este sistema, la proteína Gal4 se expresa bajo el control de un promotor ubicuo pero no puede inducir la expresión de un determinado ADNc (en un transgén UAS-X) ya que en el mismo genotipo (pero no en el mismo brazo cromosómico) se encuentra una construcción que expresa la proteína Gal80, también de forma ubicua, y que está ligada a una secuencia FRT. De esta manera, las células que, tras el proceso de recombinación mitótica, no hereden la construcción que expresa la proteína Gal80, presentarán una proteína Gal4 activa que podrá dirigir la expresión del transgén que queramos bajo control de las secuencias UAS (por ejemplo, una proteína indicadora determinada, como GFP). Es decir, la proteína Gal4, aunque se produce en todas las células, solo podrá ser funcional en aquellas en donde se haya eliminado la expresión de la proteína Gal80 gracias al proceso de recombinación mitótica y segregación de cromátidas (Lee y Luo, 1999). En esta recombinación en *trans*, el brazo cromosómico del cromosoma homólogo al que lleva las inserciones FRT con el promotor ubicuo-Gal80 puede además albergar la mutación de interés, de manera que sólo las células homocigóticas mutantes presentarán marcaje.

Los clones estudiados con este sistema se indujeron en larvas de los siguientes genotipos:

- y w *hsFLP122 tub-Gal4 UAS-GFP/+* (o Y); *FRT82B tub-Gal80/ FRT82B abd-A^{M1}*
- y w *hsFLP122 tub-Gal4 UAS-GFP/+* (o Y); *FRT82B tub-Gal80/ FRT82B Ubi-RFP*
Ubx^{6.28}
- y w *hsFLP122 tub-Gal4 UAS-GFP/+* (o Y); *FRT82B tub-Gal80/ FRT82B Ubx¹ abd-A^{D24}*
Abd-B^{D18}

Con este sistema indujimos clones mutantes para *abd-A^{M1}*, *Ubx^{6.28}* o *Ubx¹ abd-A^{D24}* *Abd-B^{D18}* siguiendo los mismos tiempos de inducción que en el caso anterior. Una diferencia con el sistema precedente, sin embargo, es que en este caso los clones se marcan por la expresión de GFP, no por su ausencia.

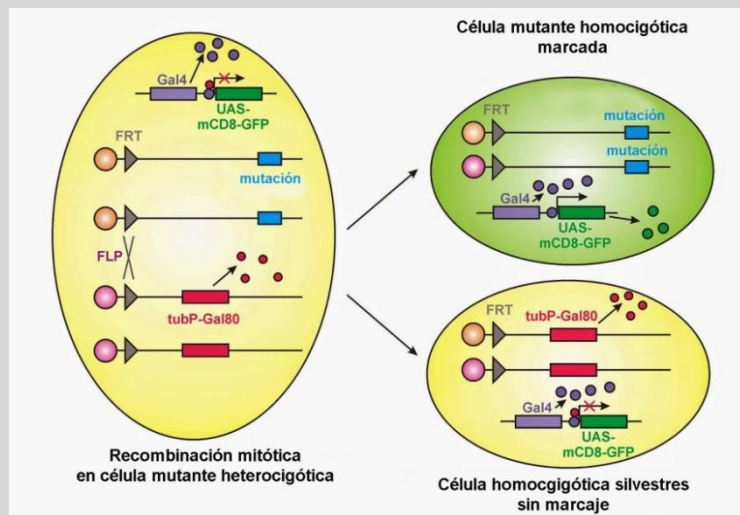


Figura M-3. El Sistema MARCM. Sistema combinado de los sistemas FLP/FRT y Gal4/UAS/Gal80. La mutación está situada distal a la secuencia FRT en el brazo cromosómico. En el cromosoma homólogo, también en posición distal a la inserción FRT, se encuentra la construcción que expresa la proteína Gal80, inhibidora del sistema Gal4/UAS, bajo el control de un promotor ubicuo. Un evento de recombinación mediada por la FLP podrá dar lugar, tras la mitosis, a dos células hijas genéticamente diferentes: una de ellas es homocigótica para la mutación y tendrá activo el sistema Gal4/UAS (al faltar la proteína Gal80) y, por tanto, el marcador que nos permita identificar las células; la otra célula será homocigótica para la construcción con Gal80 por lo que el sistema Gal4/UAS no estará activo y la célula no mutante no se verá marcada.

3.2 Inducción de clones de expresión ectópica

Los clones de expresión ectópica permiten generar grupos de células que expresan un gen de manera ectópica dentro de un tejido silvestre.

La inducción de estos clones se indujo de dos maneras diferentes:

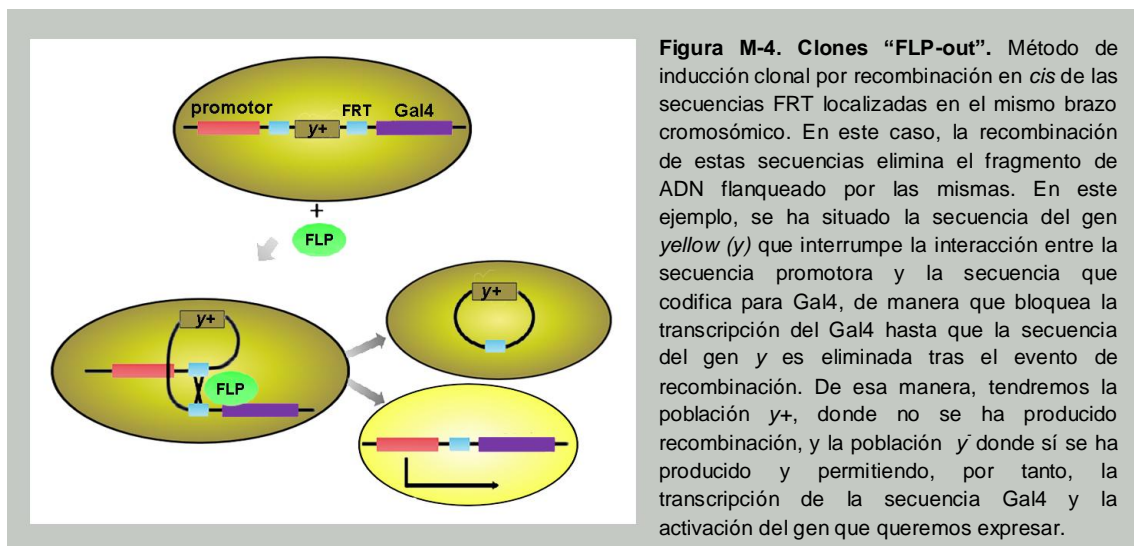
- a) Por recombinación en *cis*: En esta técnica se usa un transgén en el que un promotor ubicuo está separado de un cDNA determinado por un "cassette" que posee una señal de parada transcripcional o de parada de la traducción y está flanqueada por secuencias FRT. De esta manera, la recombinación en *cis* de las secuencias FRT inducida por la expresión de *flipasa* bajo el control de un promotor de choque térmico eliminaría el "cassette" con esa secuencia de parada activando así el gen de interés (Fig. M-4). Este proceso de recombinación no es por tanto dependiente del proceso de mitosis. A esta técnica se la denomina técnica "FLP-out" (Struhl y Basler, 1993). Este sistema se puede combinar con el sistema Gal4/UAS de manera que la secuencia de parada y los FRTs se encuentren, dentro de una misma construcción, entre el promotor ubicuo y la secuencia codificante de la proteína Gal4. Así, sólo las células en las que se produzca la recombinación de las secuencias FRT expresarán el activador transcripcional Gal4. Este proceso de recombinación puede seguirse si las células están marcadas por la ausencia o presencia de una proteína indicadora determinada como sería GFP, bajo control UAS (Ito y col., 1997). En este caso se puede expresar también cualquier otra proteína de interés para estudiar su efecto en el tejido, recurriendo también al uso de secuencias UAS. Entre las secuencias FRT se puede incluir además algún marcador que nos permita seguir el proceso de recombinación, incluso en tejido adulto. Es por ello, por lo que decidimos usar un "cassette" que presentaba el marcador *yellow + (y+)* entre las secuencias FRT en un

fondo genético mutante para este gen, *y*. De esta manera, sólo las células en las que se ha producido la recombinación de las secuencias FRT mostrarán un color cuticular amarillo determinado por el fondo genético *y*, mientras que el resto del tejido será de coloración cuticular silvestre (*y*⁺).

Los clones estudiados se indujeron en larvas del siguiente genotipo:

- *y w hsFLP122/+* (o *Y*); *act>y⁺>Gal4 UAS GFP UAS-abd-A*, donde > son secuencias FRT.

Con este sistema indujimos clones de expresión ectópica de *abd-A* mediante la expresión de la *flipasa* *hsFLP122* con un choque térmico de 5 minutos a 37°C 48-72h después de la puesta del huevo. Los clones fueron observados en discos de ala de L3 tardía (L3t) fijados dos días después de la inducción del choque térmico. Para el análisis en pupa los tiempos fueron los mismos salvo para la disección, que se efectuó en la mayoría de los casos a las 24h del comienzo de la pupación, seleccionando individualmente pupas blancas para la correcta datación, dos días después del choque térmico. Los clones en pupa se visualizaron por la presencia de GFP, mientras que en adultos se visualizaron por pérdida del gen *y*.



- b) MARCM: En este caso, además de recurrir al uso de una proteína indicadora (como GFP) mediante el sistema Gal4/UAS, se dirigirá la expresión del transgén que queramos bajo control de las secuencias UAS (en este caso, UAS-*abd-A*). Además, el brazo cromosómico homólogo al FRT *tub*-Gal80, que no presenta ninguna mutación (aunque sí la secuencia FRT), puede incluir una construcción que exprese un marcador de forma ubicua, [como por ejemplo, *armadillo-lacZ* (*arm-lacZ*)], de manera que, tras la mitosis y segregación de cromátidas, las células homocigóticas para *tub*-Gal80 no presenten el marcaje correspondiente al UAS-GFP (tampoco las heterocigóticas); además, estas células homocigóticas para *tub*-Gal80 no expresan el marcador ubicuo, permitiéndonos así distinguir las células hermanas procedentes del mismo proceso de recombinación mitótica, tal como se explica en el siguiente párrafo (Fig. M-5).

Para estudiar el efecto de la expresión ectópica de *abd-A* en el disco imaginal de ala se diseccionaron larvas y pupas con clones, identificadas previamente en la lupa de fluorescencia gracias al marcaje con GFP. Por tanto, los clones se marcan por la expresión de GFP y por el marcaje más intenso del marcador ubicuo, en este caso proporcionado por un anticuerpo contra β -galactosidasa (por tener doble dosis del transgén *arm-lacZ*). Por otra parte, su clon gemelo se detectó por la ausencia de GFP y de β -galactosidasa, mientras que el resto del tejido en el que no se ha producido este proceso de recombinación presentará una copia de *tub-Gal80* y una copia de *arm-lacZ*, lo que se traduce en una ausencia de marcaje GFP y un marcaje menos intenso con β -galactosidasa (Fig. M-5).

El genotipo de las larvas donde se indujeron los clones es:

y w hsFLP122 tub-Gal4 UAS GFP/+ (o Y) ; UAS-abd-A/+; FRT82B tub-Gal80/ FRT82B arm-lacZ.

En este sistema, procedimos igual que en el caso anterior, salvo que el choque térmico fue de 7 minutos.

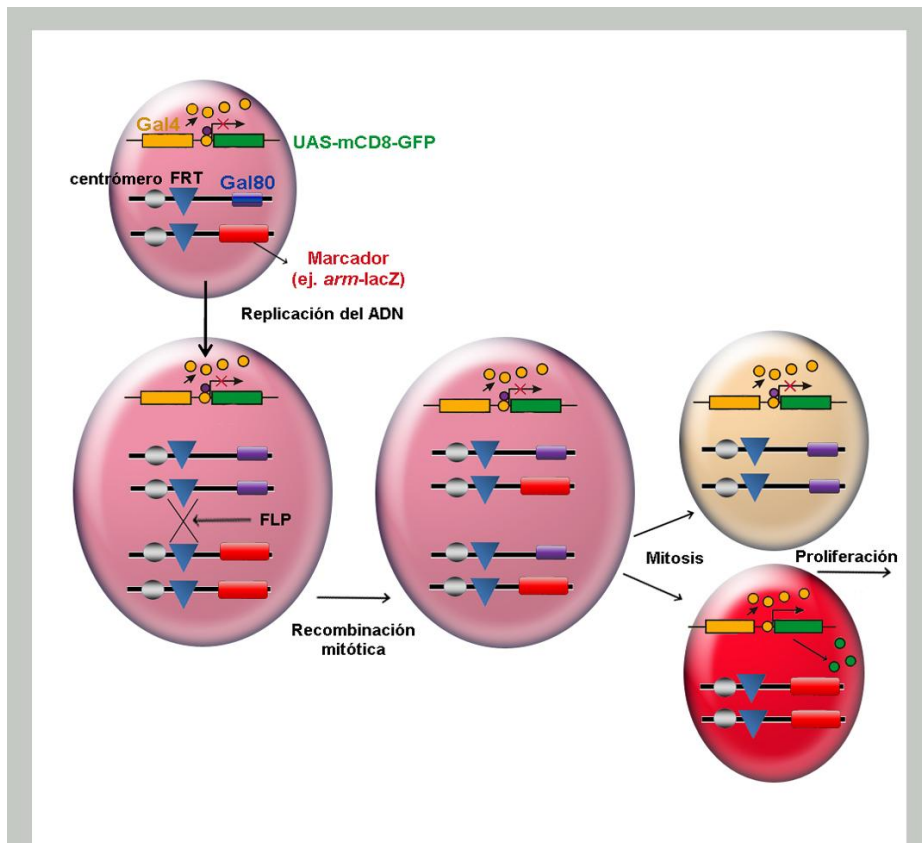


Figura M-5. El Sistema MARCM en clones de sobre-expresión con clon gemelo.

Distal a la secuencia FRT en un brazo cromosómico se encuentra una construcción que expresa un marcador de forma ubicua (ej: *arm-lacZ*). En el cromosoma homólogo, también en posición distal a la inserción FRT se encuentra la construcción que expresa la proteína Gal80, inhibidora del sistema Gal4/UAS, bajo el control de un promotor ubicuo. Un evento de recombinación mediada por la *FLP* podrá dar lugar, tras la mitosis, a dos células hijas genéticamente diferentes: Una de ellas es homocigótica para el marcador ubicuo y tendrá activo el sistema Gal4/UAS (al faltar la proteína Gal80) y, por tanto, el marcador que nos permita identificar las células (ej., GFP); la otra célula será homocigótica para la construcción con Gal80 por lo que el sistema Gal4/UAS no estará activo y la célula no se verá marcada por el marcador ubicuo ni GFP.

4. Análisis de las cutículas de adultos

Para observar el fenotipo de los individuos adultos estos se conservaron en una disolución compuesta por tres partes de etanol y una parte de glicerol. Para proceder al montaje se siguió el siguiente protocolo:

- Pasar las moscas a un Pírex escavado con agua destilada, calentando el Pírex a 95°C.
- Retirar de la fuente de calor, cortar y descartar las partes sin interés, como patas y cabeza, y hacer una incisión lateral en el abdomen.
- Retirar el agua destilada y añadir KOH 10%, calentando el pírex a 95°C durante 3 minutos para poder limpiar los tejidos blandos con ayuda de una pipeta.
- Retirar el KOH y lavar con etanol 96% un par de veces.
- Retirar el etanol 96% y añadir alcohol absoluto.
- Pasar a un portaobjetos para el montaje usando como medio de montaje Euparal.
- Cubrir con un cubreobjetos cuidando que no queden burbujas de aire.
- Sellar con laca

5. Inmunohistoquímica:

Se empleó esta técnica para estudiar los patrones de expresión de un cierto gen al detectar, mediante anticuerpos específicos, las proteínas que codifican.

5.1 Anticuerpos primarios

Anti-Abd-A: cedido por J. Casanova, desarrollado en rata (Macías y col., 1990). Usado 1/20.

Anti-Ubx: cedido por R.White, desarrollado en ratón (White y Wilcox, 1984). Usado 1/50.

Anti- β -galactosidasa: Hybridoma Bank, desarrollado en ratón. Usado 1/50.

Anti-pH3: Millipore, desarrollado en conejo. Usado 1/100.

Anti-Cyc-E: Santa Cruz Biotechnology, desarrollado en conejo. Usado 1/25.

Anti-BrdU: Roche, desarrollado en ratón. Usado 1/10.

Anti-Omb: cedido por O.Pflugfelder, desarrollado en conejo (Shen y col., 2008). Usado 1/100.

Anti- α -Eyg: cedido por Natalia Azpiazu, desarrollado en cobaya (Salvany y col., 2012). Usado 1/200.

Anti-Fasciclina III: Hybridoma Bank, desarrollado en ratón. Usado 1/20.

Anti-Dcp-1: Cell Signaling Technology, desarrollado en conejo. Usado 1/200.

5.2 Anticuerpos secundarios

Anti-rata conjugado con fluoróforo verde, rojo o azul: Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Usado 1/200.

Anti-ratón conjugado con fluoróforo verde, rojo o azul: Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Usado 1/200.

Anti-conejo conjugado con fluoróforo verde, rojo o azul: Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Usado 1/200.

Anti-cobaya conjugado con fluoróforo verde, rojo o azul: Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Usado 1/200.

Las tinciones con To-Pro-3, que marca el ADN, fueron realizadas como se ha descrito previamente (Baena-López y col., 2003).

5.3 Montaje de embriones

Se siguió el siguiente protocolo:

- Recoger embriones que han estado madurando hasta el final de la embriogénesis (el proceso dura 24h desde la ovoposición, aproximadamente).
- Decorionar dejándolos en lejía durante 2 min.
- Lavar con agua abundante.
- Proceder a la fijación con heptano y paraformaldehído (PFA) al 4% a partes iguales, agitando la muestra durante 20 min. a temperatura ambiente (TA).
- Retirar la fase inferior correspondiente al PFA, y añadir metanol, en la misma proporción que el heptano.
- Agitar 20 segundos con el vórtex para desvitelinizar.
- Eliminar el heptano (fase superior).
- Añadir más metanol y lavar 3 x 10 min. con metanol.
- Lavar con el tampón salino PBT (PBS 1x + 0'3% Tritón).
- Sustituir el PBT por Buffer de Bloqueo o BBT [PBT+1% BSA (albúmina de suero bovino)].
- Añadir el anticuerpo primario e incubar toda la noche a 4°C.
- Retirar el anticuerpo y lavar 3 x 10 min. con PBT.
- Añadir el anticuerpo secundario marcado con algún agente fluorescente e incubar durante 2h a TA.
- Lavar 4 x 15 min. con PBT.
- Quitar el PBT y poner los embriones en Vectashield (Vector Laboratorios, Inc.).
- Resuspender los embriones para que no se peguen unas cutículas a otras y poner sobre un portaobjetos.
- Cubrir con un cubreobjetos cuidando que no queden burbujas de aire.
- Sellar con laca

5.4 Disección y montaje de epidermis larvaria y epidermis pupas 0h DFP.

- Seleccionar larvas L3 tardías (L3t) (situadas en las paredes del tubo) y fijar a una superficie de Sylgard en placa Petri (Ref.DD-50-S, Living System Instrumentation) con la ayuda de alfileres.
- Cubrir con PBS 1x y proceder a cortar la larva longitudinalmente.
- Abrir la larva en libro y fijar los extremos de la epidermis con alfileres en la placa de Sylgard.
- Limpiar la larva, retirando órganos internos con ayuda de las pinzas de disección.
- Quitar el PBS 1x y añadir 800µL de PFA al 4% para fijar el tejido durante 20 minutos a TA.
- Retirar el fijador y añadir PBS 1x. Realizar varios lavados.
- Retirar los alfileres de la epidermis larvaria y recoger la epidermis en un tubo "eppendorf".
- Añadir BBT e incubar durante 1h a TA.
- Retirar el BBT y añadir anticuerpo primario, que se dejará incubar toda la noche a 4°C.
- Retirar el anticuerpo primario y lavar 4 x 15 min. con PBT.
- Añadir anticuerpo secundario e incubar durante 3h a TA.
- Lavar la muestra 4 x 15 min. con PBS 1x.
- Quitar el PBS y añadir Vectashield.
- Cortar y retirar la mandíbula y los espiráculos y poner sobre un portaobjetos.
- Cubrir con un cubreobjetos cuidando que no queden burbujas de aire.
- Sellar con laca.

5.5 Disección y montaje de discos imaginales de larva o pupa 0h DFP

- Seleccionar L3t y colocarlas en un Pírex escavado con PBS 1x.
- Cortar la larva por la mitad, dando la vuelta a la mitad anterior como un calcetín.
- Limpiar la larva retirando grasa, glándulas salivares e intestino con ayuda de las pinzas de disección.
- Quitar el PBS y añadir 300µL de PFA al 4% + 1% de ácido desoxicólico (DOC) + 1% de Tritón (X-100) para fijar el tejido durante 30 min. y permeabilizarlo para la entrada del anticuerpo.
- Retirar el fijador y añadir PBS 1x. Realizar varios lavados rápidos.
- Pasar la muestra a un tubo "eppendorf".
- Añadir BBT e incubar durante 1h a TA.
- Retirar el BBT y añadir anticuerpo primario, que se dejará incubar toda la noche a 4°C.
- Retirar anticuerpo primario y lavar 4 x 15 min. con PBT.
- Añadir anticuerpo secundario e incubar durante 2h a TA.
- Lavar la muestra 4 x 15 min. con PBS 1x.
- Quitar el PBS y añadir Vectashield.
- Separar los discos del resto de los tejidos con la ayuda de agujas de disección,
- Recoger los discos con pipeta y poner en una gota de Vectashield sobre un portaobjetos.
- Cubrir con un cubreobjetos cuidando que no queden burbujas de aire.
- Sellar con laca

5.6 Disección y montaje de pupas.

Pupas tempranas (2-6h DFP)

- Seleccionar pupas blancas.
- Secar con el pincel o con papel cada pupa.
- Poner cada pupa en un portaobjetos con cinta adhesiva de doble cara en la posición deseada y datar durante 3h o 6h, dependiendo del experimento, dejando las pupas en una placa Petri con humedad a 25°C.
- Cortar longitudinalmente con ayuda de una cuchilla no más de 10 pupas a la vez, para evitar que se sequen, y poner una gota de PBS 1x sobre ellas.
- Poner cada mitad de cada pupa en un pocillo con PBS 1x y quitar suavemente con la pipeta los órganos internos.
- Transferir a PFA 4% + 1% de ácido desoxicólico (DOC) + 1% de Tritón y dejar fijando durante 45 min. a temperatura ambiente sin agitación o con agitación suave. En el caso de epidermis sólo fijación con PFA 4% durante 20 min.
- Lavar 3 x 5 min. con PBS 1x.
- Poner en BBT (en este caso con 2% BSA) durante 1h a TA.
- Incubar con anticuerpo primario a 4°C toda la noche sin agitación.
- Lavar 3 x 10 min. en PBS 1x.
- Incubar 1h con BBT a TA (opcional).
- Incubar 3h con el anticuerpo secundario.
- Lavar 4 x 15 min. en PBS 1x.
- Quitar el PBS y añadir Vectashield.
- Quitar los discos del pupario con mucho cuidado. En el caso de montar epidermis, dejar el pupario y realizar un pequeño corte en la parte superior e inferior del pupario para permitir que se abra la estructura al montarla en plano.
- Pasar los discos o epidermis a un portaobjetos excavado y poner el cubreobjetos.
- Sellar con laca.

Pupas tardías (24h DFP en adelante)

- Seleccionar pupas blancas.
- Secar cada pupa del tubo con el pincel o con papel y ponerlas en un portaobjetos con cinta adhesiva de doble cara en la posición deseada.
- Esperar el tiempo necesario de datación (24h, 72h o 96h DFP dependiendo del experimento) dejando el portaobjetos dentro de una placa Petri con humedad a 25°C.
- Pelar las pupas para separarlas del pupario y pasarlas a un Pírex excavado con PBS 1x.
- Cortar los extremos anterior y posterior de la pupa.
- Eliminar los tejidos internos con ayuda de una micropipeta.
- Transferir a PFA 4% + 1% de ácido desoxicólico (DOC) + 1% de Tritón y dejar fijando durante toda la noche a 4°C sin agitación.
- Lavar 3 x 5 min. con PBT.
- Poner en BBT (2% BSA) durante 1h a TA.
- Incubar con anticuerpo primario a 4°C toda la noche sin agitación.
- Lavar 3 x 10min. en PBT.
- Incubar 1h con BBT a TA (opcional).
- Incubar 3h con el anticuerpo secundario.
- Lavar 4 x 15min. en PBS 1x.
- Quitar el PBS y añadir Vectashield.
- Cortar la pupa por la mitad para quedarnos con el tórax y el abdomen dorsal.
- Pasar las pupas a un portaobjetos excavado y poner el cubreobjetos.
- Sellar con laca.

5.7 Incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU)

Para detectar células en fase S del ciclo celular se usó un “Kit” de marcaje con Bromodeoxiuridina (BrdU) (Sigma-Aldrich). BrdU es un análogo a la timidina y puede ser incorporado por las células en fase replicativa de su ADN. Para esta técnica se procedió a realizar el siguiente protocolo:

- Diseccionar las larvas en PBS 1x en Pírex excavado en hielo.
- Pasar los tejidos a un tubo “eppendorf”.
- Incubar los tejidos en una solución de BrdU 0,01mM en PBS 1x durante 1h a TA.
- Retirar la solución de BrdU y lavar con PBS 1x tres veces.
- Retirar el PBS y fijar en 300 µL de PFA 4% durante 30 min.
- Retirar el PFA y lavar la muestra con PBS 1x tres veces seguidas.
- Tratar el tejido con 300 µL de HCl al 2N durante 15 min.
- Retirar el HCl y realizar 3 lavados rápidos con Tetraborato 0,1M.
- Lavar 2 x 15min. con Tetraborato.
- Realizar 3 lavados rápidos con PBS 1x.
- Lavar 2 x 15min. con PBS 1x.
- Fijar de nuevo con 300 µL de PFA 4% durante 30 min.
- Retirar el fijador y hacer 3 lavados rápidos con PBS 1x.
- Incubar en BBT durante 1h a TA.
- Incubar con el anticuerpo primario anti-BrdU (Roche) durante toda la noche a 4°C.
- Lavar 3 x 10min. en PBT 1x.
- Incubar 2h con el anticuerpo secundario a TA.
- Lavar tres veces rápidas con PBS1x.
- Lavar 3 x 20min. en PBS1x.
- Quitar el PBS y añadir Vectashield.
- Separar los discos del resto de los tejidos, recoger con una pipeta los discos y poner en una gota de Vectashield sobre un portaobjetos.

- Cubrir con un cubreobjetos cuidando que no queden burbujas de aire.
- Sellar con laca.

6 Adquisición y tratamiento de imágenes

6.1 Adquisición de fotografías

Las imágenes de microscopia óptica fueron obtenidas en un microscopio Zeiss Axiophot acoplado a una cámara digital Leica 480. Las imágenes de microscopia confocal se obtuvieron mediante sistemas Micro Radiance (Bio-Rad) acoplado a un microscopio LSM510 META (Zeiss; tres canales), y procesadas digitalmente utilizando FIJI y Adobe Photoshop CS6.

6.2 Adquisición de películas *in-vivo*

Se seleccionaron pupas blancas y se colocaron sobre un portaobjetos con cinta adhesiva de doble cara. Se dejaron desarrollar durante 48 o 72h (detallado en Resultados) a 25°C con humedad constante. Se procedió a eliminar la cubierta pupal de cada pupa y se dispusieron sobre una gota de agua en una placa Petri con el fondo de cristal rodeadas de un papel húmedo (para mantener la humedad dentro de la placa) y dispuestas dorsalmente para la filmación del abdomen dorsal. Las imágenes de microscopia confocal se obtuvieron mediante sistemas Micro Radiance (Bio-Rad) acoplado a un microscopio LSM510 META (Zeiss; tres canales) usando el Software específico de Zeiss para grabación con intervalos de tiempo y multi-posiciones para poder proceder al grabado de varios individuos por sesión.

7 Análisis estadístico

Para el análisis de células marcadas con pH3, el recuento de las células pH3 positivas fue realizado a mano haciendo uso de la herramienta “point-picker” del programa FIJI. Para ello contamos las células pH3 positivas en una parte del dominio en que se expresa *abd-A* (una porción central del área delimitada por la expresión de GFP) y comparamos este número con el obtenido en discos control con respecto al mismo área de una porción central semejante definida dentro del dominio de expresión de GFP, es decir valoramos el ratio proliferativo como número de células pH3 positivas/área. Los datos de cada disco control y experimental se recogieron en una tabla del programa Excel y se analizaron usando como herramienta de análisis estadístico una prueba paramétrica denominada t de Student. Esta prueba se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal pero el tamaño muestral es demasiado pequeño como para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación típica en lugar del valor real. Esta prueba se utiliza, por tanto, para contrastar la hipótesis nula de igualdad de medias para una muestra o entre dos muestras o grupos. Para la aplicación de la t de Student se escogió como nivel de significación un valor p de 0,05. Valores por debajo de ese valor p darían como resultado una diferencia significativa en la comparación entre poblaciones usando este tipo de análisis, lo cual se representaría con la presencia de asteriscos en la gráfica de histogramas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ o *** $p \leq 0.001$). Los datos fueron representados usando un histograma donde se representa la media poblacional con las barras de error correspondientes al error estándar.

Este mismo análisis estadístico fue utilizado en el análisis comparativo del tamaño de los clones de sobre-expresión de *abd-A* con respecto a sus clones gemelos. En este caso lo que se hizo fue medir las áreas ocupadas por cada clon.

RESULTADOS

1. Transformación de tejido presuntivo de tórax en tejido de abdomen:

Como se ha descrito en la Introducción, los genes Hox son los genes encargados de especificar la identidad segmental a lo largo del eje A-P de todos los animales bilaterales. Cuando los genes homeóticos se expresan ectópicamente en *Drosophila*, los segmentos anteriores se transforman, en general, en aquellos segmentos más posteriores. Por ejemplo, la ganancia de función de *Antp* transforma antenas en patas (Duncan y Kaufman, 1975; Schneuwly y col., 1987) y la ganancia de función de *Ubx* transforma alas en halterios (Lewis, 1978; Cabrera y col., 1985; White y Akam, 1985). Significativamente, la expresión de *Ubx* en el segundo segmento torácico produce, aparte de esta transformación, la de notum en lo que parece ser tercer segmento torácico o primero abdominal (Casares y col., 1996), es decir, en el último supuesto transformaciones distintas en apéndices y tronco. Esto es aún más evidente si se analizan los cambios tras la activación de *abd-A*: las alas se transforman en halterios pero el notum lo hace en abdomen (Casares y col., 1996; Morata y Sánchez-Herrero, 1999). Recíprocamente, la falta de *Ubx* transformaría A1 en tórax. Como tórax y abdomen se desarrollan de forma muy distinta en los periodos larvario y pupal (ver Introducción), decidimos estudiar estos procesos en más detalle. La Figura R-1 sintetiza los dos tipos de experimentos principales realizados: ganancia de función de *abd-A* en el disco imaginal de ala en la región presuntiva de notum y pérdida de función de *Ubx* en el primer segmento abdominal.

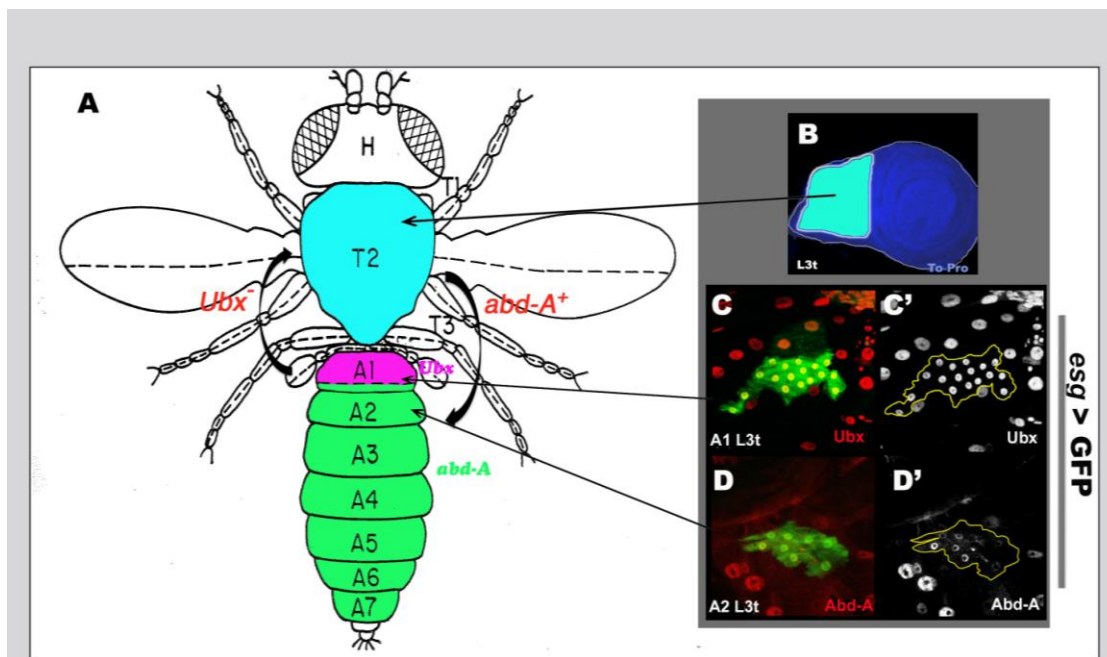


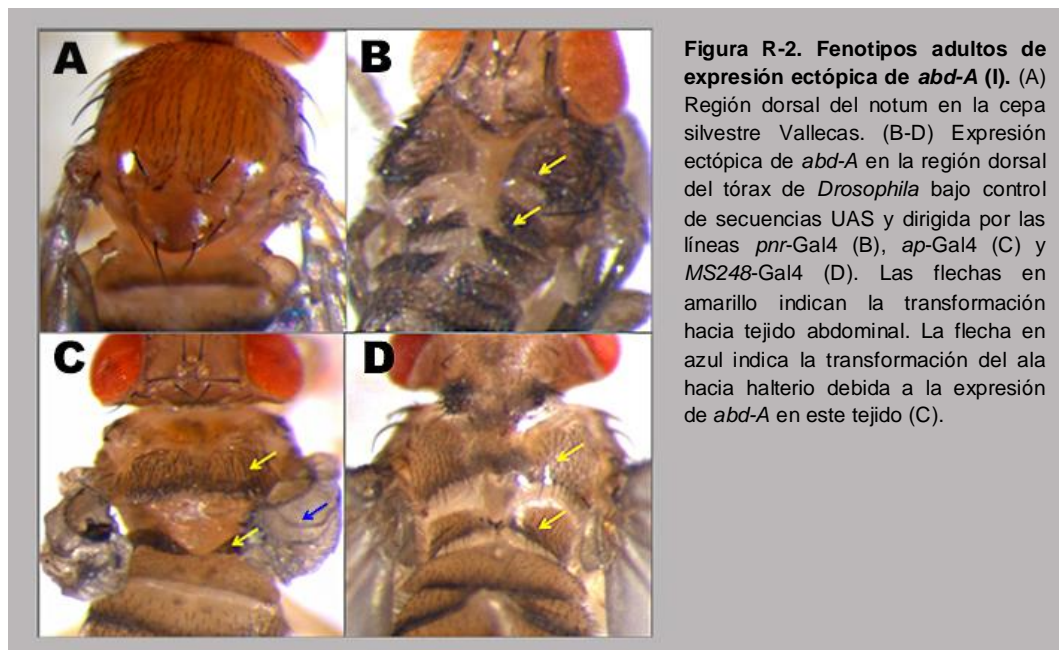
Figura R-1. Descripción del abordaje de los experimentos. (A) El dibujo representa las dos aproximaciones experimentales básicas propuestas en este proyecto: a) la transformación de tejido torácico hacia abdominal por medio de la expresión ectópica del gen *abd-A*; b) La transformación de tejido abdominal del segmento A1, hacia tejido torácico T2 mediante la inducción de la falta de función del gen *Ubx*. A la derecha se muestra la expresión de estos genes en los tejidos bajo estudio. En B se muestra un disco de ala de larva de tercer estadio tardío, L3t, donde ninguno de estos genes se expresa en condiciones silvestres. La línea blanca delimita la región presuntiva de tórax que dará lugar al notum, indicado en el dibujo en color azul claro. En C, C' y D, D' se muestra la presencia de las proteínas *Ubx* (en rojo en C, en blanco en C') y *Abd-A* (en rojo en D, en blanco en D') en los segmentos abdominales en larvas de tercer estadio tardío (L3t) de genotipo *esg-Gal4 UAS-GFP*, siendo *Ubx* específica del segmento abdominal A1, donde la señal de *Ubx* se representa en magenta en el dibujo. En D, podemos ver la presencia específica de la proteína *Abd-A* en los histoblastos (en rojo en D, en blanco en D'); en este caso se muestra un detalle del segmento A2 (nido anterior dorsal), representado en verde en el dibujo.

1.1 Expresión ectópica de *abd-A*

abd-A es el principal gen homeótico que funciona como inductor de identidad abdominal, siendo capaz de diferenciar tejido abdominal en regiones diferentes a las que expresan de manera endógena dicho gen, como la región torácica (Casares y col, 1996). Por este motivo, en este proyecto nos hemos centrado principalmente en las transformaciones que tienen lugar en el eje principal del cuerpo de *Drosophila* debidas a cambios en la expresión de este gen (Fig. R-1).

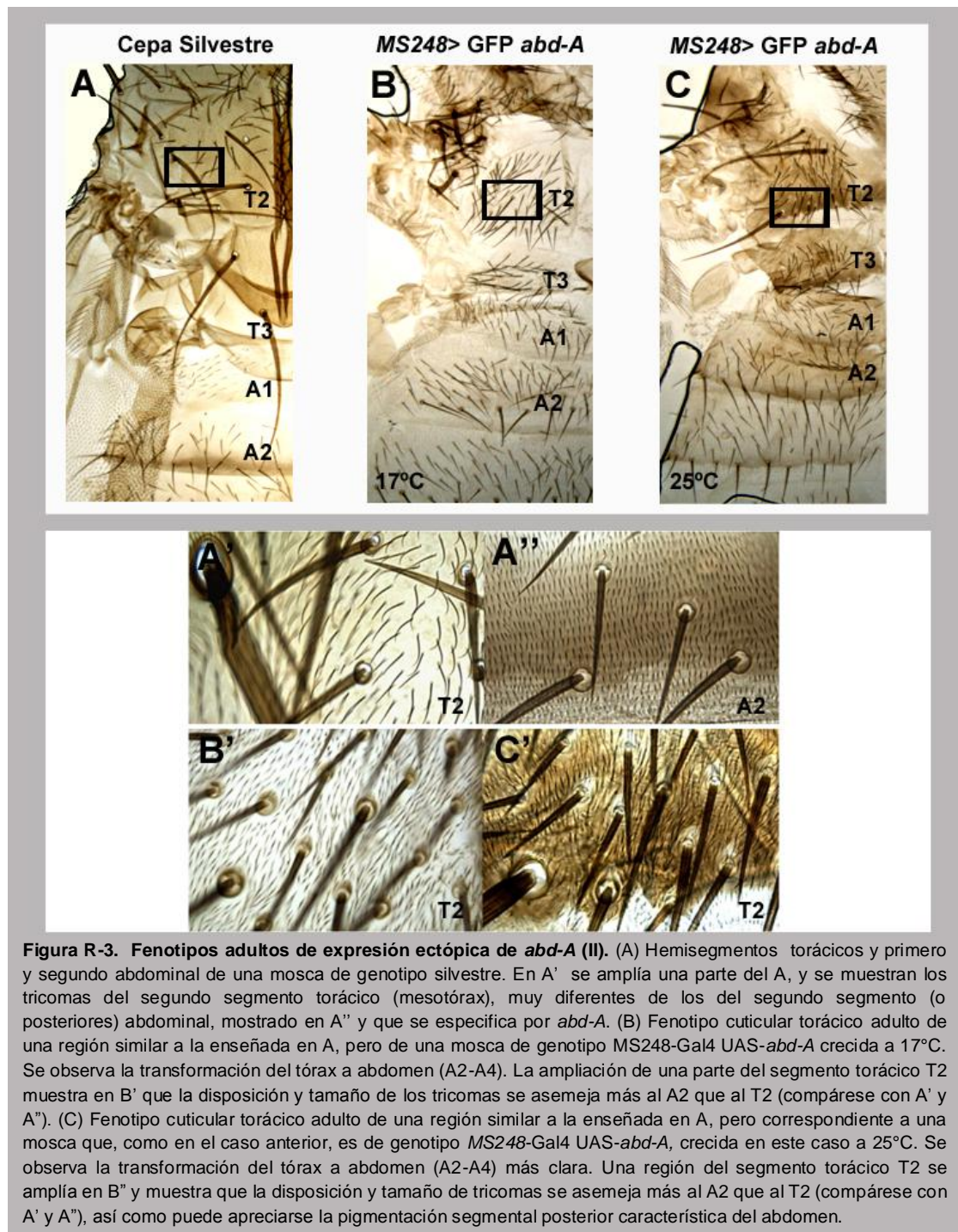
1.1.1 Fenotipos adultos

Recurriendo al uso de diferentes líneas Gal4 (*pannier*-Gal4 [*pnr*-Gal4], *apterous*-Gal4 [*ap*-Gal4], *MS248*-Gal4) y a una construcción UAS-*abd-A*, tras la expresión ectópica de este gen con estas líneas se observan claras transformaciones de la región torácica en tejido abdominal (Figs. R-2 y R-3). La expresión de *abd-A* con las líneas *pnr*-Gal4 y *ap*-Gal4 (Figura R-2 B, C, el notum silvestre se muestra en R-2 A y R-3 A) tuvo que realizarse recurriendo al uso de la proteína Gal80^{ts} como herramienta inhibidora del sistema binario Gal4/UAS. Esta proteína, que expresamos ubicuamente, inhibe la actividad transcripcional del Gal4 a 17°C mientras que permite funcionar a la proteína Gal4 a 29°C (ver Material y Métodos), y la hemos usado debido a que la expresión de *abd-A* con ambas líneas Gal4 produce letalidad temprana.



La inducción del sistema Gal4/UAS se produjo desde el comienzo del periodo larvario, es decir, al tercer día del desarrollo de los embriones en condiciones de baja temperatura (17°C). En el caso de la línea *pnr*-Gal4, los individuos mueren en farato y presentan severos problemas en el cierre dorsal (Fig. R-2 B), sin embargo, los faratos que sacamos de pupa presentan claras anomalías del tejido torácico, transformándose a lo que parece tejido abdominal. En el caso de la línea *ap*-Gal4 la transformación hacia tejido abdominal es clara en el T2, donde además observamos la transformación de alas en halterios (flecha azul en Fig. R-2 C), ya que esta línea se expresa también en la región presuntiva del apéndice del disco imaginal de ala (ver Casares y col., 1996). En el caso de la línea *MS248*-Gal4, la expresión ectópica de *abd-A* no produjo letalidad embrionaria y los experimentos con la misma se han realizado a 17°C y 25°C (Fig. R-3).

En este último caso, la transformación hacia tejido abdominal es más clara (Fig. R-2 D), tanto a 17 °C (Fig. R-3 B, B') como a 25°C (Fig. R-2 D, Fig.R-3 C'). Las transformaciones son evidentes por la forma del segmento, la disposición y tamaño de cerdas y la pigmentación en la parte posterior, típicas de segmentos abdominales. La observación detallada muestra que los tricomas adquieren también características de tricomas abdominales (Fig. R-3 A'', B', B''). Ya que las líneas Gal4 dirigen la expresión también en el tercer segmento torácico, transformaciones similares se ven en este segmento (Fig. R-3 B, C). Incluso la parte dorsal de la cabeza cambia a abdomen con las líneas *MS248-Gal4* o *pnr-Gal4* (aunque con polaridad invertida) y el A1 se transforma a un segmento posterior. Los fenotipos observados en adultos en estas condiciones confirman que *abd-A* es un gen inductor de identidad abdominal (Casares y col., 1996).



1.1.2 Expresión ectópica de *abd-A* y proliferación celular

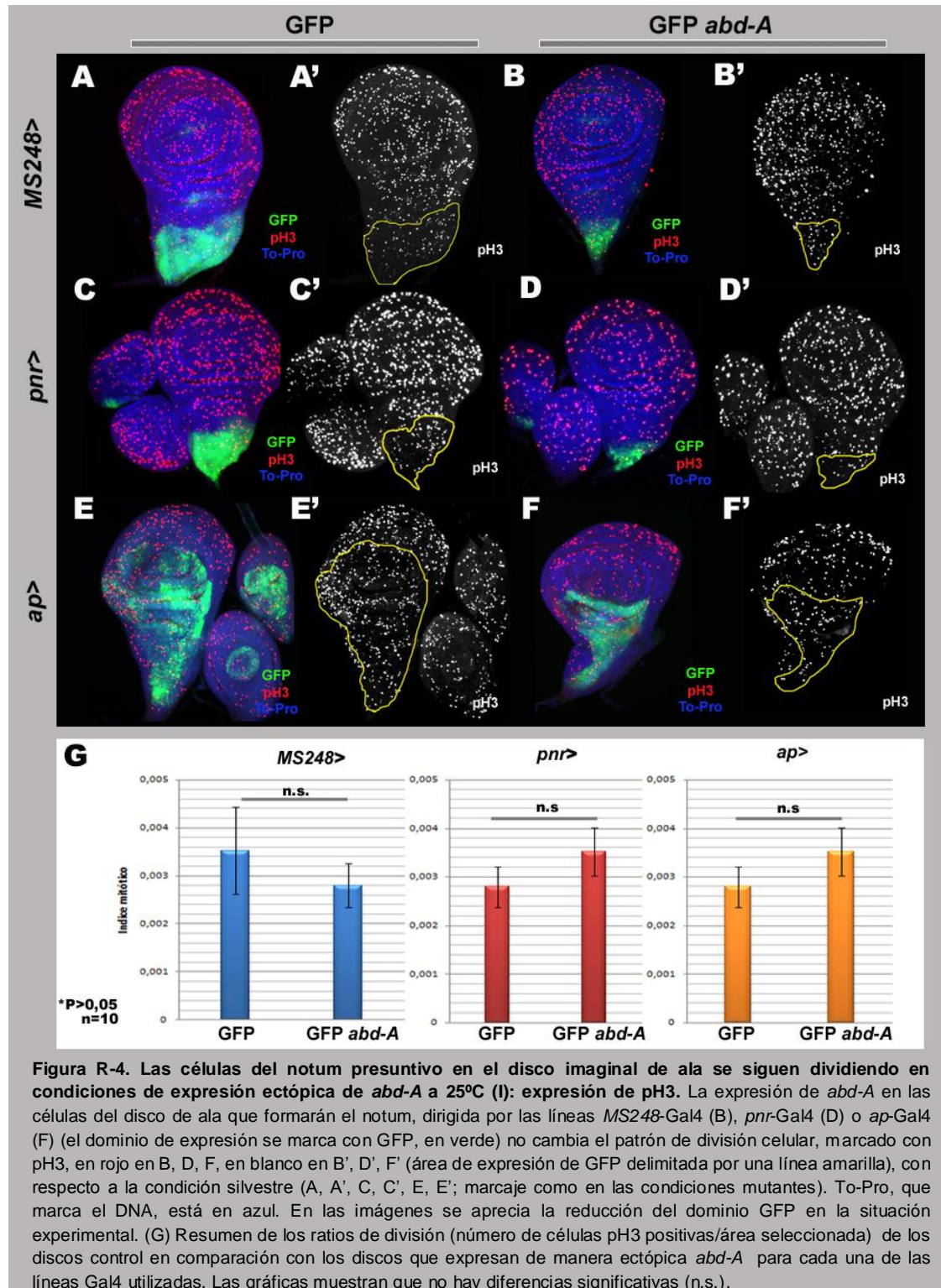
Partiendo de las transformaciones producidas, nos preguntamos si *abd-A* sería suficiente para conferir quiescencia proliferativa a las células presuntivas de notum del disco de ala, ya que los histoblastos (precursores del abdomen) no se dividen durante los estadios larvarios. Si *abd-A* controlase este comportamiento proliferativo, esperaríamos que se modificase el mismo al expresarse este gen ectópicamente en el nuevo tejido. Cabe recordar que los discos imaginales presentan un comportamiento proliferativo muy diferente a los histoblastos, ya que se dividen fundamentalmente durante los estadios larvarios, reduciendo su ritmo proliferativo durante la pupación hasta el cese de la proliferación a las pocas horas de formarse el pupario (Schubiger and Palka, 1987; Bryant y Schmidt, 1990; Guo y col., 2016). Para contestar esta pregunta decidimos hacer de nuevo uso de las líneas *pnr-Gal4*, *ap-Gal4* y *MS248-Gal4* ya que dirigen la expresión en la región del disco que se transforma en abdomen (Fig. R-2B, C, D; ver Material y Métodos). Puesto que la línea *MS248-Gal4* es la que combinaba mejores transformaciones con viabilidad hasta faratos al menos, es la que se usará preferentemente en los siguientes experimentos. Por estar inserta en el cromosoma X, y para sortear los problemas derivados de la mayor expresión en machos debidos a la compensación de dosis, los estudios se realizaron en larvas o pupas hembras. Dado que consideramos esta pregunta importante para comprender si el patrón de crecimiento y la formación de patrón van acoplados, decidimos analizar el problema de forma exhaustiva, con varios experimentos y marcadores.

I. Expresión ectópica de *abd-A* en la región presuntiva de notum del disco de ala y análisis de marcadores de ciclo celular en estadio de larva III tardía (L3t).

Para comprobar si las células siguen ciclando en la zona presuntiva de notum del disco de ala en condiciones de expresión ectópica de *abd-A*, se recurrió al uso de distintos marcadores del ciclo celular: a) Fosfo-Histona 3 (pH3). El anticuerpo contra esta proteína refleja la marca post-traducciona que se produce en la Histona 3 característica de los cromosomas condensados que van a entrar en la fase de mitosis (Wei y col., 1999) (Fig. R-4); b) Bromodeoxiuridina, o BrdU, es un análogo de la timidina, nucleótido que se incorpora al ADN durante el proceso de replicación, por lo que el uso de BrdU permite detectar las células que entran en fase S (Gratzner y col., 1975) (Fig. R-5); c) Ciclina E (CycE). Esta ciclina se une a Cdk2 y se considera una proteína esencial como reguladora de la progresión de la fase G1 del ciclo celular, por lo que se utiliza como marcador de fase G1 (Sherr, 1994) (Fig. R-6); d) las construcciones UAS-GFP-E2F y UAS-RFP-CycB del sistema Fly-Fucci (Zielke y col., 2014). La combinación de estas dos construcciones sirve de sensor de los niveles de E2F y Ciclina B (CycB), y su expresión será inducida bajo control de líneas Gal4. E2F es una proteína que regula la expresión de genes que determinan la entrada en la fase S del ciclo, mientras que CycB es una ciclina cuya síntesis comienza en la fase S, alcanzado sus mayores niveles durante G2, y cuya unión a Cdk1 permite la entrada en mitosis (Fig. R-7).

Cuando analizamos la expresión del marcador de mitosis pH3 en nuestras condiciones experimentales observamos que las células en las que se induce la expresión de *abd-A* muestran expresión de este anticuerpo (Fig. R-4 B, B', D, D', F, F', comparar con los controles en A, A', C, C' y E, E', respectivamente). Sin embargo, para asegurarnos de que no existían diferencias significativas en la condición experimental respecto a la silvestre, decidimos contar las células pH3 positivas en un área determinada dentro del dominio en que se expresa *abd-A* (definido por la expresión de GFP) y comparamos este número con el obtenido en discos control en un área similar, es decir, valoramos el ratio proliferativo como número de células pH3 positivas/área (siendo el tamaño del área escogido el mismo). En el análisis estadístico con la prueba t de Student y escogiendo como nivel de significación un p-valor de 0,05 observamos que las diferencias entre discos control y experimentales no fueron estadísticamente significativas (Fig. R-4 G).

Tampoco fuimos capaces de observar diferencias claras entre discos experimentales y controles en la incorporación de BrdU (Fig. R-5 B, B', D, D', F, F', comparar con los controles en A, A', C, C' y E, E') o la expresión de Cyc-E (Fig. R-6 B, B', D, D', F, F', los controles en A, A', C, C' y E, E'). Ninov y col., 2007 detallan que la re-entrada en división mitótica de los histoblastos en pupa es dependiente de los altos niveles de CycE acumulados durante el periodo larvario. Sin embargo, su expresión tras la inducción de *abd-A* en el disco de ala no parece inducir una proliferación diferente del control. Finalmente, analizamos la expresión de las construcciones FlyFucci que se encuentran bajo el control de secuencias UAS y que, como se indicó anteriormente, revelan las variaciones de expresión de E2F y CycB (Zielke y col., 2014).



Estas proteínas varían sus niveles a lo largo del ciclo celular, y en estas construcciones, la secuencia de las mismas involucrada en la regulación de su degradación se encuentra asociada a los fluorocromos GFP y RFP, respectivamente, los cuales se encuentran bajo el control de la secuencia promotora de la *ubiquitina (ub)*. La presencia de estos fluorocromos nos sirve para marcar las diferentes fases del ciclo celular siguiendo el siguiente código de color: G1, señal fuerte GFP debido a los niveles altos de E2F y ausencia de señal RFP, ya que el fluorocromo RFP se encuentra asociado a la porción de Cyc-B que permite que vaya a degradación en G1; S, señal suave de RFP, debido al comienzo de la síntesis de Cyc-B y nada de señal verde ya que el fluorocromo GFP se encuentra asociado a la porción de E2F que va a degradación en fase S; G2, señal débil GFP e intensa de RFP; M, señal intensa de GFP y RFP (Zielke y col., 2014). El estudio de la expresión de estas construcciones bajo el control de la línea *MS248-Gal4*, y concomitante expresión de *abd-A*, muestra marcaje en todas las combinaciones señaladas, por lo que el tejido sigue proliferando, sin observar una detención clara en ninguna de las fases (Fig. R-7 B-B''', el control en A-A''').

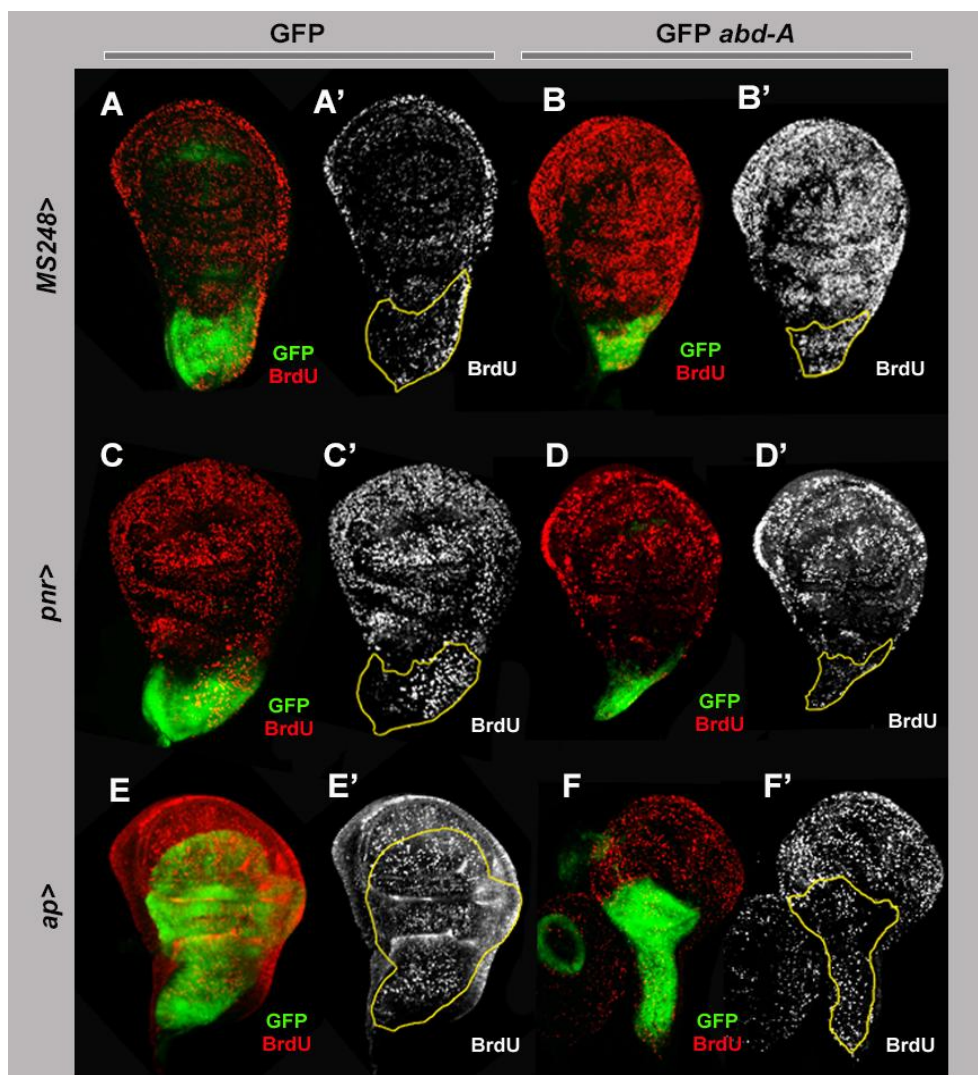


Figura R-5. Las células del notum presuntivo en el disco imaginal de ala se siguen dividiendo en condiciones de expresión ectópica de *abd-A* a 25°C (II): incorporación de BrdU. (A, A', C, C', E, E') Expresión de GFP (en verde) y señal de incorporación de BrdU (en rojo o blanco) bajo el control de las líneas *MS248-Gal4* (A, A'), *pnr-Gal4* (C, C') y *ap-Gal4* (E, E'). (B, B', D, D', F, F') Expresión simultánea de GFP (en verde) y *abd-A* y señal de incorporación de BrdU (en rojo o blanco) dirigida con las mismas líneas, *MS248-Gal4* (B, B'), *pnr-Gal4* (D, D') y *ap-Gal4* (F, F'). La línea de color amarillo delimita el área correspondiente a la zona de expresión de GFP. La incorporación de BrdU en función del área indicada no parece diferir drásticamente en discos experimentales en comparación con la situación control.

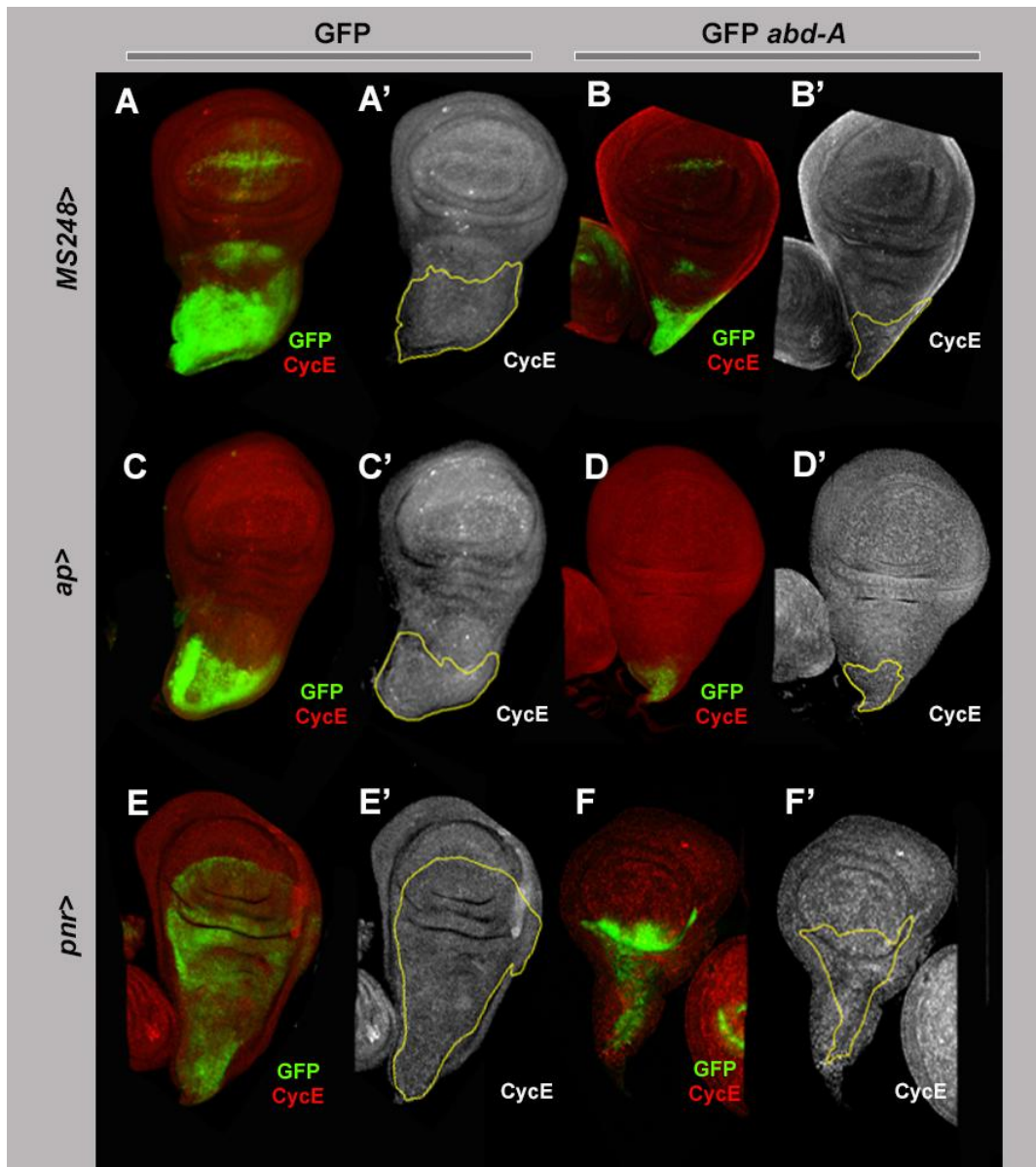
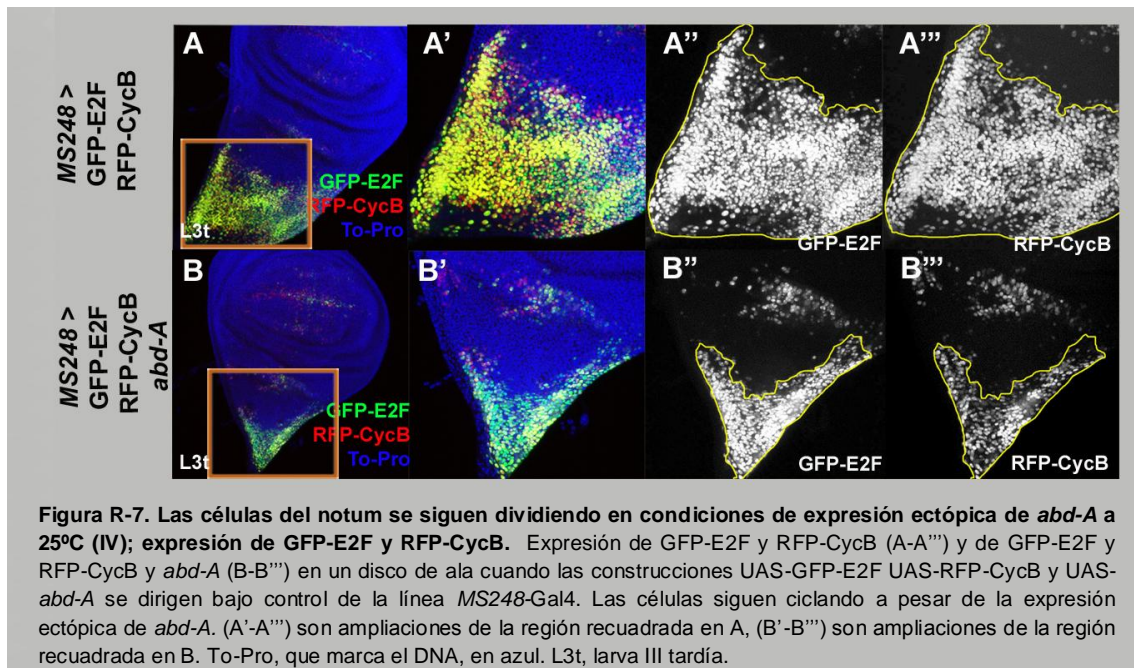


Figura R-6. Las células del notum presuntivo en el disco imaginal de ala se siguen dividiendo en condiciones de expresión ectópica de *abd-A* a 25°C (III): expresión de ciclina E. (A, A', C, C', E, E') Expresión de GFP (en verde) y señal de expresión de ciclina E (en rojo o blanco) bajo el control de las líneas *MS248-Gal4* (A, A'), *pnr-Gal4* (C, C') y *ap-Gal4* (E, E). (B, B', D, D', F, F') Expresión simultánea de GFP (en verde) y *abd-A* y señal de expresión de ciclina E (en rojo o blanco) dirigida con las mismas líneas, *MS248-Gal4* (B, B'), *pnr-Gal4* (D, D') y *ap-Gal4* (F, F'). La línea de color amarillo delimita el área correspondiente a la zona de expresión de GFP. La expresión de ciclina E en función del área indicada no difiere significativamente entre los discos experimentales y los controles.



Este análisis de los diferentes marcadores de ciclo celular nos decía que las células que expresaban *abd-A* en esta región del disco imaginal de ala seguían ciclando, por lo que concluimos que *abd-A* no es suficiente para inducir la entrada en quiescencia de las células en las que se expresa. Sin embargo, no podemos afirmar, a partir de estos resultados, que *abd-A* no sea necesario en el control del comportamiento proliferativo de los histoblastos. En cualquier caso, para definir mejor el ritmo proliferativo en las células experimentales, y ya que en los experimentos anteriores se observa una reducción del tamaño en la zona presuntiva de notum (estudiada más adelante) que puede dificultar en ocasiones el análisis, decidimos inducir clones de recombinación mitótica que expresaran *abd-A* y estudiar su proliferación. Para la comparación del crecimiento de estos clones nos serviremos de los clones gemelos como control.

II. Inducción de clones de sobre-expresión de *abd-A* en el disco imaginal de ala.

Para confirmar que *abd-A* no estaba modificando el ciclo celular, decidimos inducir clones de sobre-expresión mediante el sistema MARCM (Ver Material y Métodos) (Lee y Luo, 1999). Indujimos los clones en larvas de segundo estadio de genotipo *y w hsFLP122 tub-Gal4 UAS-GFP* (o *y w hsFLP122 tub-Gal4 UAS-GFP/+*); *UAS-*abd-A*/+*; *FRT82B tub-Gal80/FRT82B arm-lacZ*, por lo que los clones que expresan *abd-A* se pueden seguir por el marcaje con GFP y una señal más intensa de *arm-lacZ* al llevar dos copias de esta construcción, mientras que los clones gemelos, producidos en el mismo evento de recombinación mitótica, se marcan por la pérdida del marcador *arm-lacZ*. El análisis comparativo del área ocupada por cada clon y su clon gemelo dentro del mismo tejido nos da una idea de cómo han crecido ambas poblaciones, por lo que, si *abd-A* estuviese modificando el ciclo celular (inhibiendo la división) veríamos una clara diferencia de tamaño entre ambos. La observación de los clones nos sugiere que no existe tal diferencia tanto en el eje X-Y (Fig. R-8 A-A'') como en el eje Z (Fig. R-8 C-C'). El análisis estadístico para comparar el área de los clones experimentales y gemelos, realizado mediante el test paramétrico t de Student, confirma la previa apreciación visual (Fig. R-8 B). Sin embargo, tal y como veíamos en los casos de expresión ectópica de *abd-A* con las diferentes líneas Gal4, los mismos clones que crecen como células del disco imaginal, diferencian como

abdomen en el adulto (Fig. R-8 D). Recopilando todos los datos anteriores concluimos que la expresión ectópica de *abd-A* en el disco imaginal de ala es suficiente para cambiar la morfología de tórax a abdomen, pero no afecta al ritmo de proliferación celular, de forma que las células se siguen dividiendo (en larva al menos) como las que van a formar tórax y no como las que van a formar abdomen (histoblastos). En otras palabras, en nuestras condiciones experimentales, y en comparación con lo que ocurre en el abdomen, podemos decir que crecimiento y diferenciación (o formación de patrón) parecen presentarse como procesos desacoplados.

Por otra parte, cabe destacar, que en los experimentos de expresión de *abd-A* con distintas líneas Gal4 se observaba una reducción considerable del tamaño del dominio que expresa este gen por lo que decimos comprobar si este efecto podía ser debido a que el tamaño de las células estaba siendo modificado o a que estas células estaban sufriendo apoptosis.

*yw hsFLP122 tub-Gal4 UAS-GFP;
UAS-abd-A/+; FRT tub-Gal80/FRT arm-lacZ*

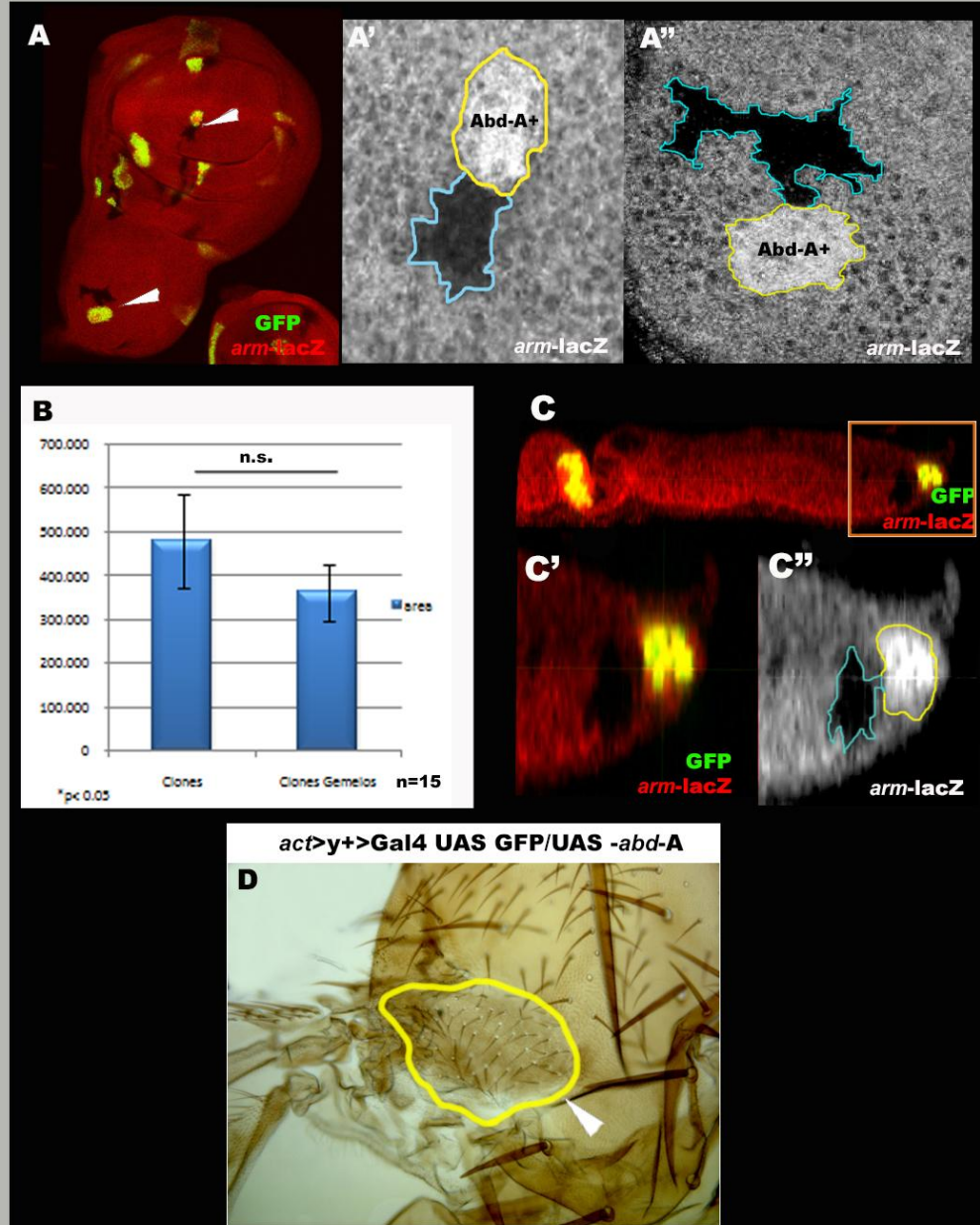
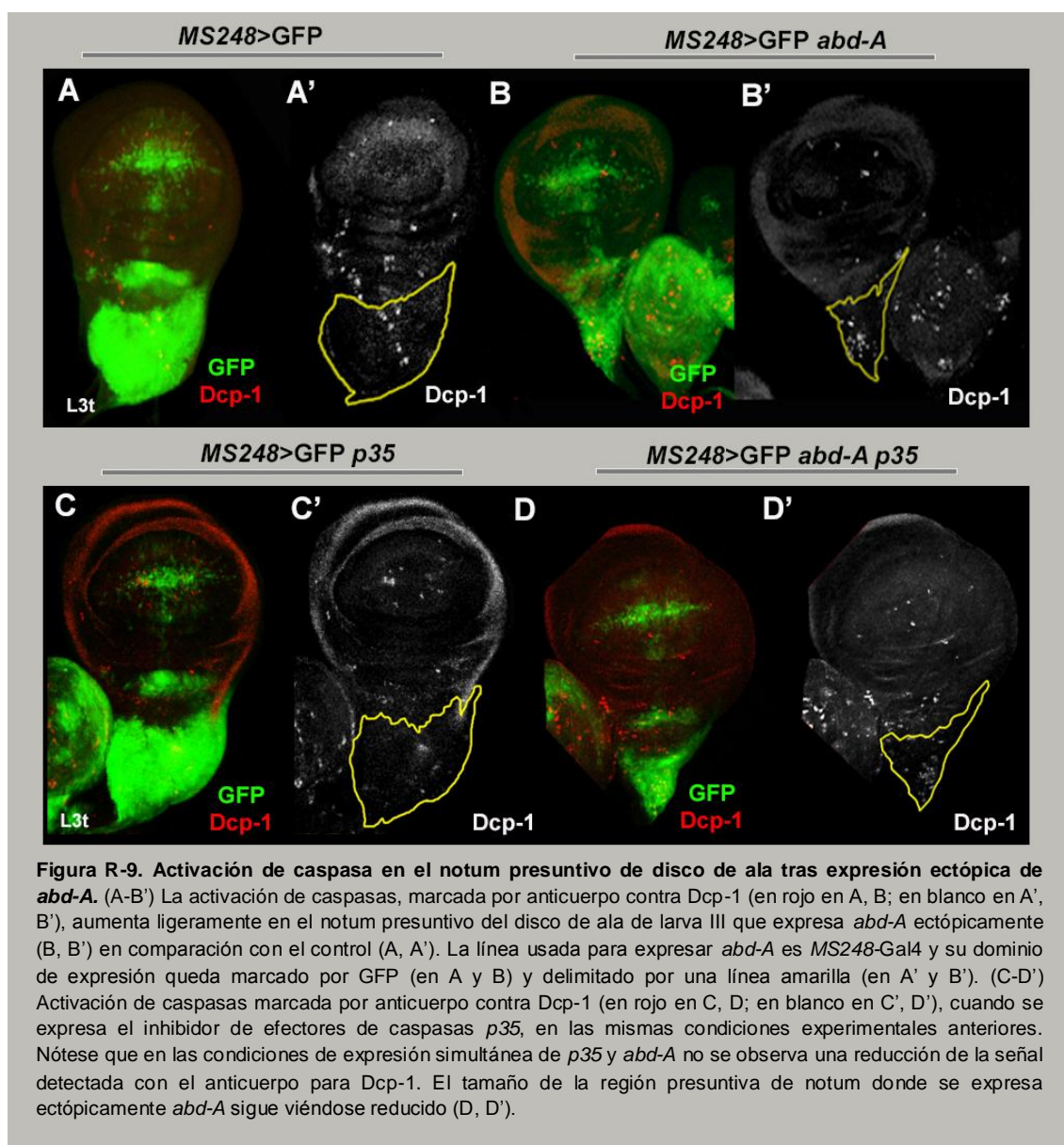


Figura R-8. Los clones que expresan *abd-A* en el disco imaginal de ala se dividen durante el periodo larvario como sus clones gemelos. (A-A'') Clones MARCM de expresión ectópica de *abd-A* en el disco de ala de una larva de tercer estadio marcados con GFP (en verde en A). Los clones gemelos están marcados por ausencia de *armadillo-lacZ* (en rojo en A, en gris en A', A''). Las flechas blancas indican dos de estas parejas de clones en el "pouch" o bolsa (flecha superior de la imagen) y zona presuntiva de notum (flecha inferior de la imagen), y están ampliados en A', y A'', respectivamente. En ambos casos el área del clon mutante (rodeado por una línea amarilla) no es muy diferente al la del clon gemelo silvestre (rodeado por una línea azul). (B) Gráfica resumen del tamaño de los clones de expresión ectópica de *abd-A* frente a sus clones gemelos usados como control. Las diferencias no son estadísticamente significativas. Las mediciones se realizaron solo en la región del notum. Clones, hace referencia a tejido de genotipo mutante y clones gemelos al control. n.s., no significativo. (C-C') Visión en Z de uno de los clones del notum (C, ampliado en C', C''), marcado con GFP (verde en C, C') y señal más intensa de β -galactosidasa, debido a la doble copia de *arm-lacZ* (rojo en C, C', en blanco en C'') junto a su clon gemelo, marcado por ausencia de GFP y de *arm-lacZ*. Nótese que el área ocupada por el clon mutante y el gemelo no difieren apenas. (D) Clon sistema "FLP-out" de expresión ectópica de *abd-A* en tejido adulto marcado con *y⁺* (en un fondo mutante *yellow*) indicado con una flecha y rodeado por una línea amarilla. El tejido que expresa *abd-A* muestra una transformación a abdomen.

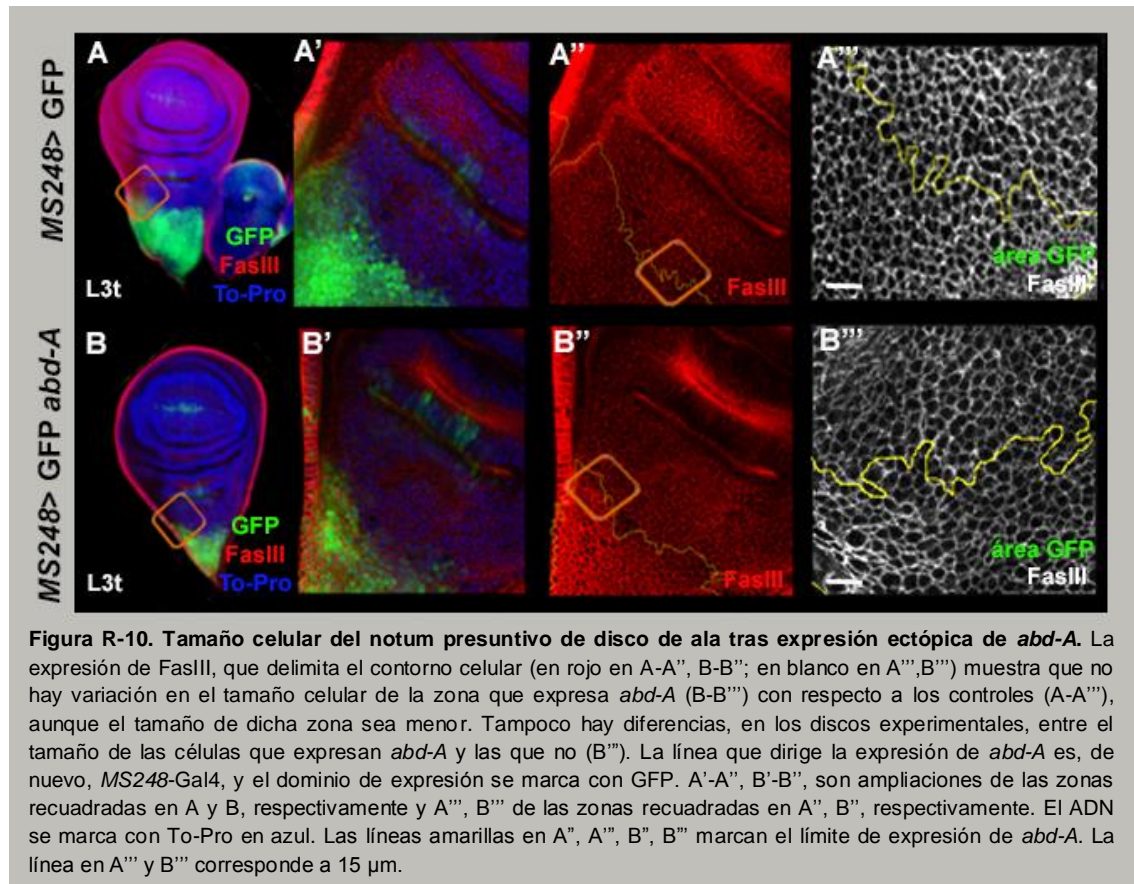
III. Análisis de apoptosis y cambio de tamaño celular en condiciones de expresión ectópica de *abd-A*.

La reducción del dominio del disco de ala causada en condiciones experimentales por la expresión ectópica de *abd-A* podría ser debida a una inducción de apoptosis debida a los altos niveles de proteína Abd-A como consecuencia del uso del sistema Gal4/UAS. Haciendo uso de marcadores de activación de muerte celular con un anticuerpo contra la caspasa de *Drosophila* (Dcp-1) homóloga a la Caspasa 3 de mamíferos, (Song y col., 1997; Fan y Bergmann, 2010), observamos que hay una cierta inducción de muerte en el dominio de expresión de *abd-A* bajo el control de *MS248-Gal4* (Fig. R-9 B, B') comparado con discos control, A, A'. Esto se visualizaba mejor al mirar en detalle las células GFP positivas donde nos parecía observar fragmentación nuclear. Para saber si esta muerte podía ser la causa del fenotipo decidimos expresar a la vez *abd-A* y *p35*, inhibidor de efectores de caspasas (Hay y col., 1994), en el dominio del notum bajo el control de la línea *MS248-Gal4* usando el sistema Gal4/UAS (Fig. R-9 C-D').



Cuando realizamos este experimento seguimos viendo reducción del dominio en el que expresamos ectópicamente *abd-A*, sugiriendo que la muerte celular no es la responsable de la reducción de tamaño, o que la titulación de la proteína Gal4 (3 construcciones UAS) hace que la expresión de la proteína P35 no sea suficiente para inhibir esa muerte.

Para saber si la reducción del dominio en el que expresamos ectópicamente *abd-A* se debía a cambios en el tamaño celular, recurrimos a la visualización de un marcador de membrana como *Fasciclina III* (FasIII) (Snow y col., 1989, Wells y col., 2013). Nuestras observaciones indican que el área de las células que expresan ectópicamente *abd-A* no varía con respecto a las células del disco que no lo expresan (Fig. R-10 A-A'''; B-B'''). En definitiva, observamos que la reducción del dominio del disco de ala en el que expresamos ectópicamente *abd-A* no se deben a cambios en el tamaño celular.



IV. Expresión ectópica de *abd-A* en el primordio del disco de ala y análisis del marcador de ciclo celular pH3 en estadios pupales.

El análisis anterior no reveló cambios significativos en el comportamiento proliferativo de las células que expresan *abd-A* ectópicamente en el periodo larvario. Sin embargo, y dado que los discos imaginales cesan en gran medida en su proliferación tras la entrada en pupación (Schubiger y Palka, 1987; Bryant y Schmidt, 1990; Guo y col., 2016) y que la inducción de la proliferación de los histoblastos ocurre durante el periodo de pupa, pensamos que quizá *abd-A* pudiera dirigir la división celular en el modo típico de histoblastos durante el periodo de pupación. Analizando el patrón del marcador de ciclo celular pH3 en pupas a diferentes tiempos (2h DFP, 6h DPF, 24h DPF) en situaciones control y situaciones de expresión ectópica de *abd-A* con la línea *MS248-Gal4* (Fig. R-11), comprobamos en primer lugar que la zona presuntiva de notum del disco de ala continúa dividiéndose de forma robusta en discos silvestres en estadios en que la proliferación en la zona que originará el ala decae (Fig. R-11 C, C'). Publicaciones previas habían estudiado la proliferación del disco en pupa, pero solo exhaustivamente en la región del "pouch" (o bolsa) y "hinge", concluyendo que se reducía su proliferación a la entrada en pupación, deteniéndose las células en G2 antes de los dos últimas mitosis que tendrán lugar de las 12-24h DFP (Schubiger y Palka, 1987; Bryant y Schmidt, 1990; Guo y col., 2016). Nosotros observamos que, efectivamente, el número de mitosis en el "pouch" es muy reducido en pupas más allá de las 2h DFP (Fig. R-11 A, C). Sin embargo, la región del disco de ala que dará lugar al notum, porción del eje corporal de la mosca, continúa dividiéndose incluso más allá de las 24h DFP (Fig. R-11 E-E"). Es decir, al comparar el comportamiento proliferativo en pupa entre situación experimental y control, no podemos concluir si en la primera las células se dividen como histoblastos o como células del disco, ya que en ambos casos hay divisiones abundantes en condiciones silvestres (Fig. R-11 C, D, E, F). Por tanto, no hemos podido definir claramente este punto, que requeriría un estudio temporal muy pormenorizado.

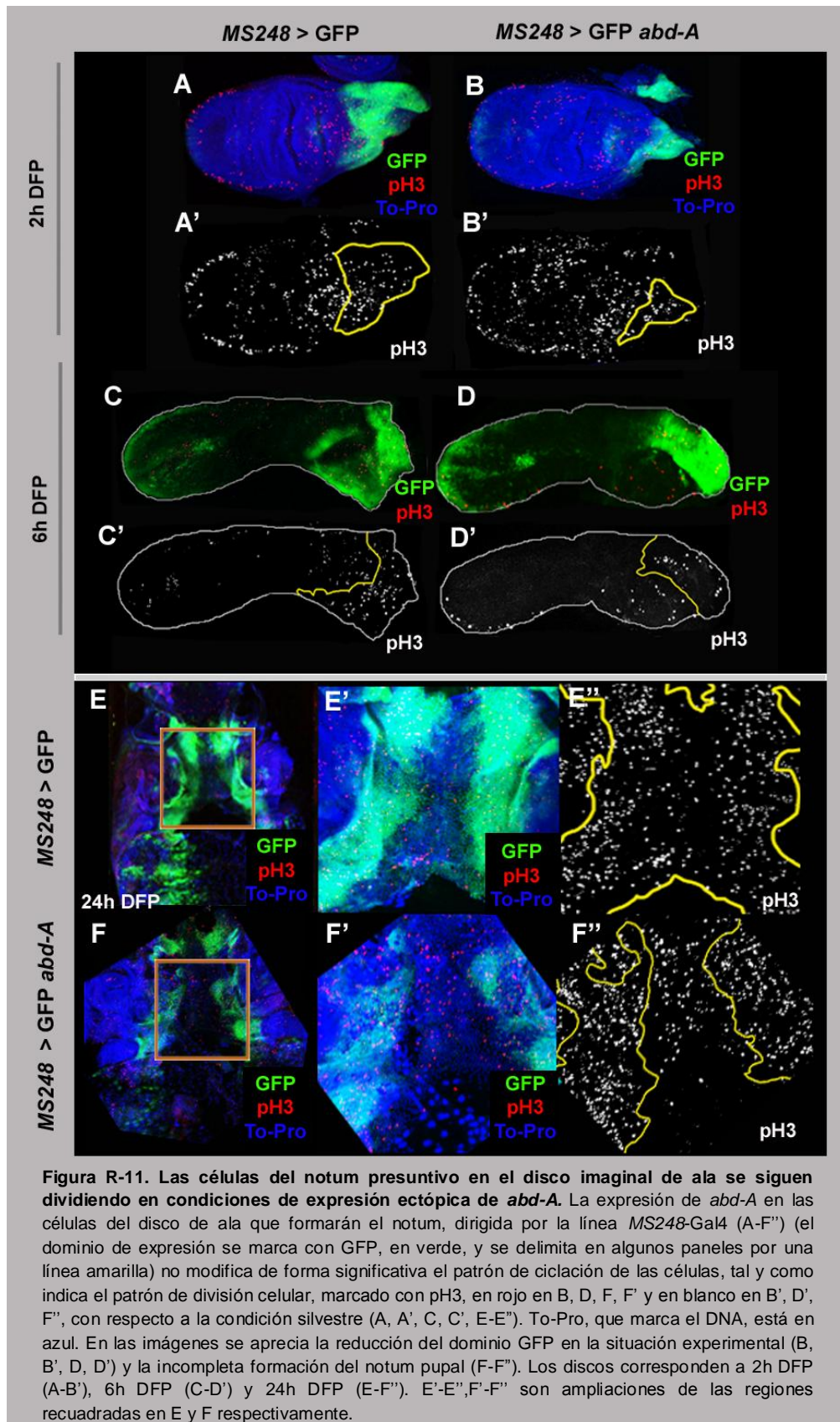


Figura R-11. Las células del notum presuntivo en el disco imaginal de ala se siguen dividiendo en condiciones de expresión ectópica de *abd-A*. La expresión de *abd-A* en las células del disco de ala que formarán el notum, dirigida por la línea *MS248-Gal4* (A-F'') (el dominio de expresión se marca con GFP, en verde, y se delimita en algunos paneles por una línea amarilla) no modifica de forma significativa el patrón de ciclación de las células, tal y como indica el patrón de división celular, marcado con pH3, en rojo en B, D, F, F' y en blanco en B', D', F'', con respecto a la condición silvestre (A, A', C, C', E-E''). To-Pro, que marca el DNA, está en azul. En las imágenes se aprecia la reducción del dominio GFP en la situación experimental (B, B', D, D') y la incompleta formación del notum pupal (F-F''). Los discos corresponden a 2h DFP (A-B'), 6h DFP (C-D') y 24h DFP (E-F''). E'-E'', F'-F'' son ampliaciones de las regiones recuadradas en E y F respectivamente.

V. Expresión ectópica de *abd-A* en el primordio del disco de ala y análisis del tamaño celular tras la entrada en pupación.

Los histoblastos presentan un comportamiento proliferativo peculiar en las primeras horas de pupación, ya que como se comentaba en la Introducción, sufren en las primeras 8h DFP tres divisiones rápidas y sincrónicas sin crecimiento celular, por lo que el tamaño celular disminuye progresivamente (Roseland y Schneiderman, 1979; Ninov y col., 2009). Este comportamiento no está descrito para el disco imaginal de ala durante ese periodo. Por ello, decidimos ver que ocurría con el tamaño celular en discos de pupas de 0h y 5h DFP, momento este último en el que en situación silvestre los histoblastos ya han sufrido al menos 1 o 2 divisiones (problemas técnicos dificultan la observación a las 8-10h DFP). Si las células del disco imaginal de ala se estuvieran comportando como histoblastos en nuestra situación experimental de sobre-expresión de *abd-A*, cabría esperar una reducción de su tamaño a las 5h DFP. Sin embargo, antes de proceder al experimento, comprobamos cómo, efectivamente, las células de los nidos se dividen sin crecimiento celular, observando la reducción en el tamaño nuclear a las 5h DFP respecto a las 0h DFP (Fig. R-12 A, A', B, B'). Un cambio particular a reseñar es el cambio morfológico que experimentan las células tras la entrada en pupación, pasando de presentar un aspecto festoneado (0h DFP Fig. R-12 A, A'', A''') a un aspecto más redondeado o poligonal (5h DFP; Fig. R-12 B, B'', B'''), además de un cambio en el comportamiento picnótico de los núcleos, entendiéndolo como tal un marcaje más intenso con el producto intercalante To-Pro 3, que nos permite marcar el ADN (Fig. R-12 A, A', B, B').

Cuando estudiamos lo que ocurría con el tamaño celular en discos de ala de pupas de 0h DFP (Fig. R-12 C-D'') y 5h DFP (Fig. R-12 E-F''), haciendo uso del marcador de membrana Fasciclina III (FasIII), no observamos diferencias aparentes en el tamaño celular entre las células silvestres de ambos estadios (Fig. R-12 C'', D'', E'', F'', ver células que no expresan *abd-A*) ni entre las células que expresan la proteína Hox a las 0 y 5h (Fig. R-12 D'' y F'') ni de estas con las silvestres del mismo disco (Fig. R-12 D'' y F''). Por consiguiente, asumimos que las células que expresan *abd-A* parecen seguir dividiéndose como disco y no como histoblastos en las primeras horas de la pupación.

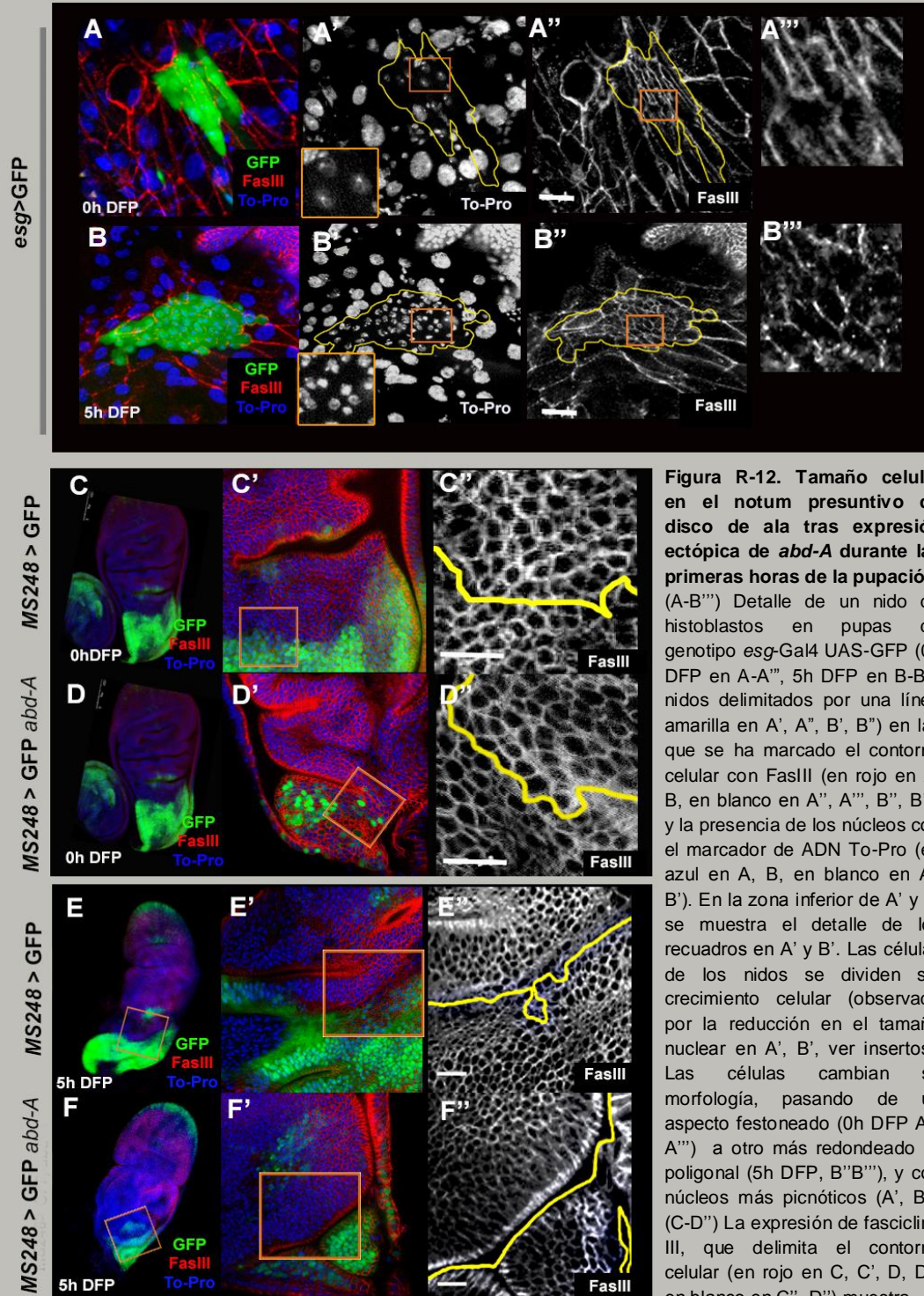


Figura R-12. Tamaño celular en el notum presuntivo de disco de ala tras expresión ectópica de *abd-A* durante las primeras horas de la pupación. (A-B''') Detalle de un nido de histoblastos en pupas de genotipo *esg-Gal4 UAS-GFP* (0h DFP en A-A'', 5h DFP en B-B'', nidos delimitados por una línea amarilla en A', A'', B', B'') en las que se ha marcado el contorno celular con FasIII (en rojo en A, B, en blanco en A'', A''', B'', B''') y la presencia de los núcleos con el marcador de ADN To-Pro (en azul en A, B, en blanco en A', A'', B'', B'''). En la zona inferior de A' y B' se muestra el detalle de los recuadros en A' y B'. Las células de los nidos se dividen sin crecimiento celular (observado por la reducción en el tamaño nuclear en A', B', ver insertos). Las células cambian su morfología, pasando de un aspecto festoneado (0h DFP A'', A''') a otro más redondeado o poligonal (5h DFP, B'', B'''), y con núcleos más picnóticos (A', B'). (C-D'') La expresión de fasciclin III, que delimita el contorno celular (en rojo en C, C', D, D'', en blanco en C'', D'') muestra

que no hay variación en el tamaño de las células en la zona que expresa *abd-A* (D-D'') con respecto a los controles (C-C'') o las células que no expresan *abd-A* en el disco mutante (D-D'') a las 0h DFP. La línea que dirige la expresión de GFP (C-C'') o GFP y *abd-A* (D-D'') es *MS248-Gal4*, y el dominio de expresión se marca con GFP (en verde, zona delimitada con una línea amarilla en C'' y D''). C' y D' son ampliaciones de las zonas recuadradas en C y D, respectivamente y C'', D'' de las correspondientes de C' y D'. (E-F'') A las 5h DFP, la expresión ectópica de *abd-A* en el disco de ala (F-F'') con la misma línea Gal4 tampoco hace variar el tamaño celular respecto a la zona adyacente (silvestre), al igual que ocurre en la condición en que solo expresamos GFP (E-E''). El marcaje con GFP, el límite de dominio de expresión (línea amarilla) y las ampliaciones sucesivas, se muestran tal y como se indica en C-D''. La expresión de FasIII delimita el contorno celular (en rojo en E-E', F-F''; en blanco en E'', F'') y el DNA se marca con To-Pro en azul. En todos los casos, la barra inferior que aparece en las imágenes A'', B'', C'', D'', E'' y F'' corresponde a 15µm.

1.1.3 *abd-A* como inductor de destino abdominal: regulación de la expresión de marcadores de diferenciación específicos de abdomen.

Dado que al inducir la expresión ectópica de *abd-A* el tejido diferencia como abdomen pero crece al parecer como disco, quisimos comprobar si el patrón de expresión típico de histoblastos de ciertos genes se encontraba modificado y en qué momento del desarrollo tenía lugar este cambio. Es decir, si, al menos en nuestras condiciones experimentales, crecimiento y formación de patrón y diferenciación se presentaban como procesos desacoplados en comparación con el desarrollo normal del abdomen. Quisimos estudiar primeramente genes cuya expresión pudiera ser inducida por *abd-A*, es decir, que se expresaran en histoblastos y no en células de la región del notum del disco de ala, durante los periodos larvario y pupal. Procedimos a estudiar marcadores descritos como indicadores de diferenciación en tejido abdominal pupal, ver si estaban siendo inducidos por *abd-A*, y si esta inducción se producía, como era de esperar, tras el periodo larvario.

Se sabe, que el patrón cuticular abdominal se determina en los primeros dos días del desarrollo pupal, donde tienen lugar la proliferación y migración de los histoblastos y la destrucción de las CELs. Durante este periodo existe una evolución de la expresión de genes como *en*, *hh*, *ptc* y *omb* (Struhl y col., 1997; Kopp y col., 1997; Lawrence y col., 1999; Murone y col., 1999; Bischoff y col., 2013; Ingham, 2016). Nosotros seleccionamos *omb* como marcador de diferenciación de abdomen, ya que el resto de marcadores descritos tienen también expresión en el notum presuntivo del disco imaginal de ala, mientras que *omb* no se expresa en esta región (Grimm y Pflugfelder, 1996). Por ello, la activación de la expresión de *omb* nos daría información sobre la función de *abd-A* en el establecimiento de un patrón abdominal.

Según lo descrito, la proteína Omb se detecta en altos niveles a ambos lados del borde de compartimento A-P de manera simétrica a partir de las 18h DFP (Kopp y Duncan, 1997). Haciendo uso de la línea *MS248-Gal4*, expresamos ectópicamente *abd-A* en el notum presuntivo para comprobar si se inducía expresión de *omb* y cuándo tenía lugar. En el caso de la larva de tercer estadio, donde *omb* no se expresa, en la condición silvestre, ni en la zona presuntiva de notum ni en los histoblastos (Fig. R-13 A, A', E, E'), no se detectaron cambios en su expresión en el disco imaginal de larva tras inducir *abd-A*, como cabía esperar (Fig. R-13 B, B'). Sin embargo, en la pupa mutante de 24h DFP aparece en la región del notum un patrón de *omb* característico que prefigura la disposición de segmentos abdominales (Fig. R-13 D-D", flechas amarillas), semejante al que se observa en el abdomen en esas horas del desarrollo (Fig. R13 F, F'), y a diferencia de la situación control, donde no se detectaron niveles de altos de Omb en ningún patrón claramente definido y, en cualquier caso, claramente diferente del anterior (Fig. R-13 C-C"). Es decir, *abd-A* no opera como regulador del ciclo de los histoblastos en nuestras condiciones experimentales pero si como claro inductor de identidad abdominal, en el momento del desarrollo esperado, y en concordancia con los fenotipos observados.

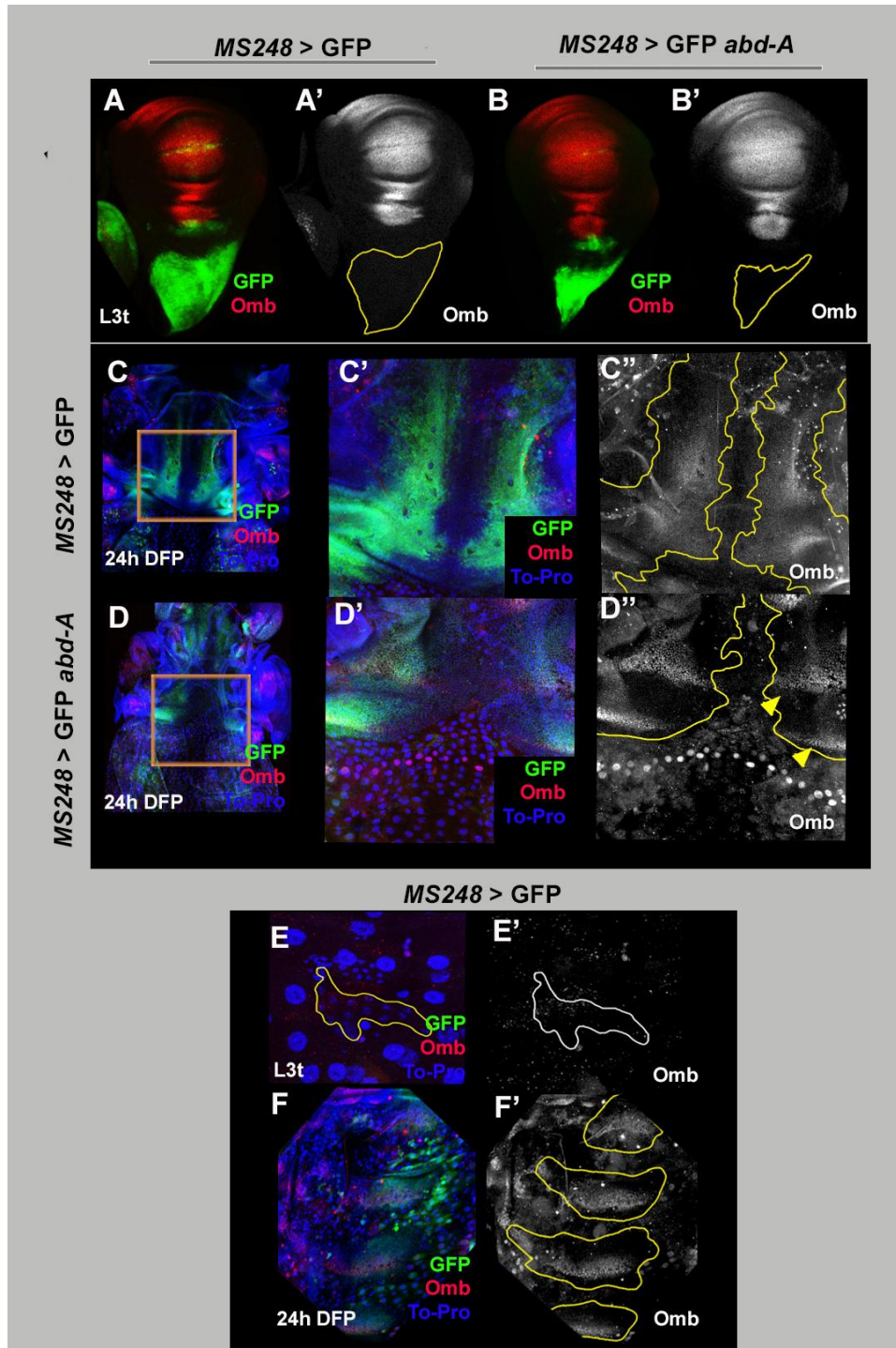


Figura R-13. Las células del notum expresan el gen *omb* en condiciones de expresión ectópica de *abd-A* únicamente en el periodo de pupación. (A-B') Omb (en rojo en A, B, en blanco en A', B') no se expresa en las células presuntivas de notum del disco de ala de larvas de tercer estadio tanto si expresan solo GFP (A, controles, *MS248-Gal4 UAS-GFP*) o GFP y *abd-A* (B, *MS248-Gal4 UAS-GFP UAS-abd-A*). (C-D'') En pupas de 24h DFP de genotipo *MS248-Gal4 UAS-GFP* se ve una señal débil de *omb* en algunas de estas células (C, ampliado el rectángulo en C', C'', *omb* en blanco en C''), mientras que en pupas de edad similar y de genotipo *MS248-Gal4 UAS-GFP UAS-abd-A* se observa expresión en dos franjas horizontales que asemejan la expresión en el abdomen (F, F') y se corresponden con los segmentos abdominales que se forman en el notum (D, ampliado el rectángulo en D', D'', *omb* en blanco en D''). (E-F') La expresión en histoblastos sólo aparece en los estadios de pupa (F, F') mientras que en L3t, larva III tardía, los histoblastos no muestran señal de Omb (E, E').

1.1.4 *abd-A* como inductor de destino abdominal: distorsión del patrón característico de notum.

Como indicamos anteriormente, no encontramos en la literatura marcadores específicos que determinen la formación de abdomen y se expresen en histoblastos larvarios. Decidimos, por tanto, estudiar los cambios de expresión génica en nuestras transformaciones homeóticas analizando variaciones en la transcripción de genes expresados en el periodo larvario en el disco imaginal y no descritos en los histoblastos. Recurrimos así al uso de los marcadores *eyegone* (*eyg*) y *neuralized* (*neu*). La proteína Eyg se expresa en la región de notum definiendo la región anterior de este territorio, y siendo necesaria para su formación (Aldaz y col., 2005), mientras que la proteína Neu es codificada por el gen proneural del mismo nombre y, además de caracterizarse por su importancia en el desarrollo embrionario, promueve la formación de los precursores de órganos sensoriales que darán lugar a las quetas (Bellen y col., 1989; Boulianne y col., 1991), por lo que nos permitiría ver cómo y cuándo efectivamente el patrón definido para la región del tórax se estaba viendo modificado para dar lugar al patrón característico de abdomen.

En el caso de *eyg*, observamos que en discos de ala que expresan *abd-A* el patrón estaba viéndose alterado por la reducción del dominio en el que sobre-expresamos este gen, y que solo unas pocas células dentro del dominio de expresión del gen Hox expresan *eyg* (Fig. R-14 B, B', la condición silvestre en A, A'). Para poder definir mejor el efecto de *abd-A* indujimos clones de expresión ectópica de *abd-A* y estudiamos la expresión de *eyg*. Como se muestra en la Figura R-14 C-C'', *abd-A* es capaz de reprimir la expresión de este gen en el territorio de notum durante el periodo larvario.

En el caso de *neu*, observamos lo que ocurría con su expresión usando como línea indicadora la línea *A101-lacZ* (Bellen y col., 1989; Huang y col., 1991). Primero quisimos comprobar si esta línea tenía expresión en los histoblastos larvarios. Como se muestra en la Figura R-15 A, A', todas las células de los nidos muestran señal. Este marcador, por tanto, nos servía como un gen de expresión larvaria en histoblastos, algo que no habíamos anticipado. En el disco de ala *MS248 UAS-GFP*, *neu* muestra un patrón de expresión característico (Fig. R-15 B, B'). Tras inducir la expresión ectópica de *abd-A* en el tejido presuntivo de notum observamos expresión de la línea *neu-lacZ* en el dominio marcado por GFP, pero la reducción del tamaño de la región impide concluir claramente sobre si existe modificación del patrón (Fig. R-15 C, C'). A pesar de ello, sí podemos afirmar que no todas las células del dominio mutante expresan este marcador, como sería de esperar si adoptasen el patrón de expresión propio de histoblastos larvarios. Por el contrario, en estadios más tardíos, a las 24h DFP, el patrón característico de esta línea en el tórax mutante se estaba viendo claramente modificado (Fig. R-15 F-F'''), pareciéndose más al patrón característico de abdomen en esas horas del desarrollo (Fig. R-15 D-D''') que al patrón propio del tórax (Fig. R-15 E-E''').

Uno de los reguladores de la expresión de los genes proneurales como *achaete/scute* o *neu* en grupos discretos de células en el disco de ala es *wg* (Zecca y col., 1996; Neumann y Cohen, 1997; Lin y Perrimon, 1999; Strigini y Cohen, 2000). Este gen, aunque también es importante en el desarrollo temprano de muchas estructuras (Baker, 1987; Swarup y Verheyen, 2012), se expresa tanto en el notum como en el abdomen, y en ambos es necesario para el desarrollo y diferenciación del tejido (Phillips y Whittle, 1993; Shirras y Couso, 1996). El patrón de expresión, sin embargo, no es idéntico en el disco (zona presuntiva de notum) y en un segmento abdominal larvario (Phillips y Whittle, 1993; Shirras y Couso, 1996), por lo que queríamos saber cuándo se modificaba el mismo al expresar *abd-A*. Para visualizar la expresión del gen *wg* recurrimos de nuevo a una línea indicadora, en este caso *wg-lacZ* (Lessing y Nusse, 1998).

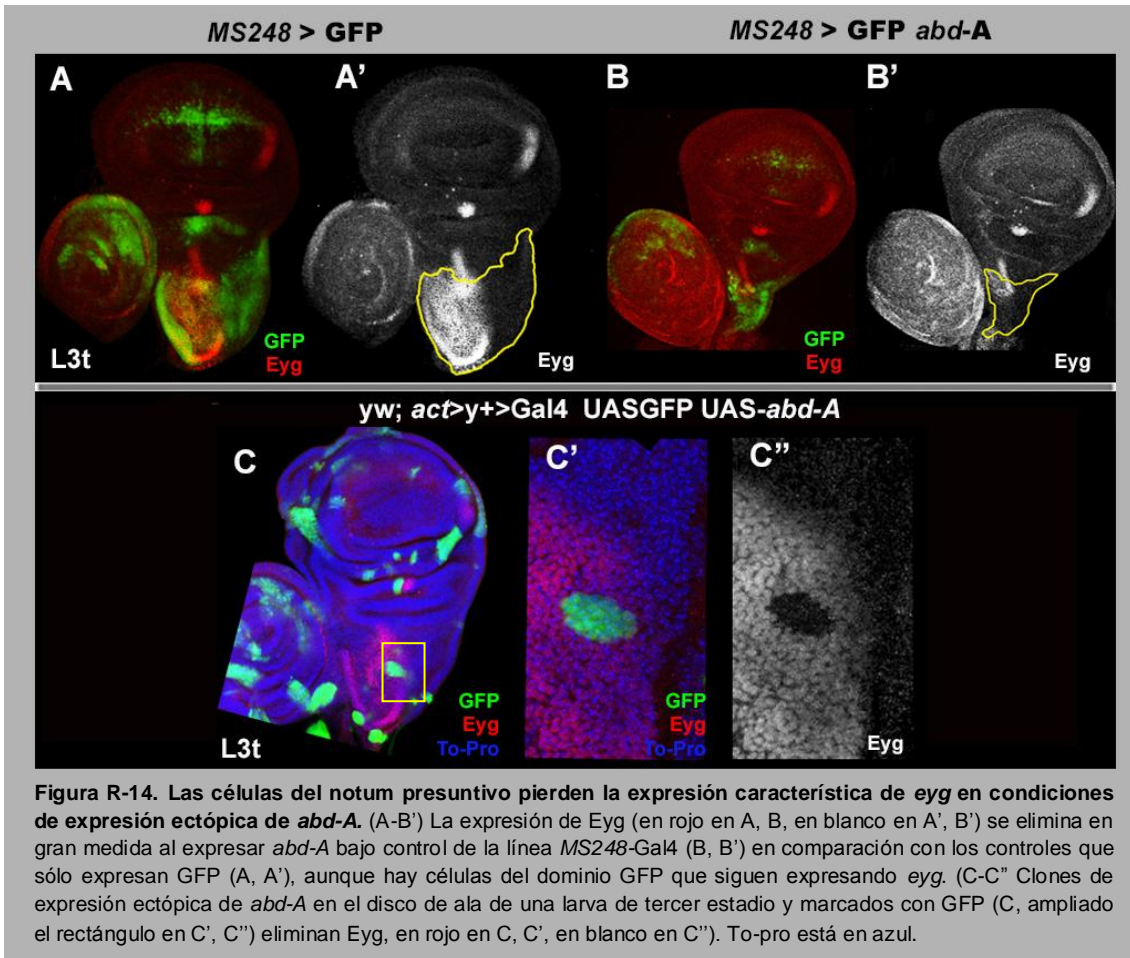


Figura R-14. Las células del notum presuntivo pierden la expresión característica de *eyg* en condiciones de expresión ectópica de *abd-A*. (A-B') La expresión de *Eyg* (en rojo en A, B, en blanco en A', B') se elimina en gran medida al expresar *abd-A* bajo control de la línea MS248-Gal4 (B, B') en comparación con los controles que sólo expresan GFP (A, A'), aunque hay células del dominio GFP que siguen expresando *eyg*. (C-C'') Clones de expresión ectópica de *abd-A* en el disco de ala de una larva de tercer estadio y marcados con GFP (C, ampliado el rectángulo en C', C'') eliminan *Eyg*, en rojo en C, C', en blanco en C''). To-pro está en azul.

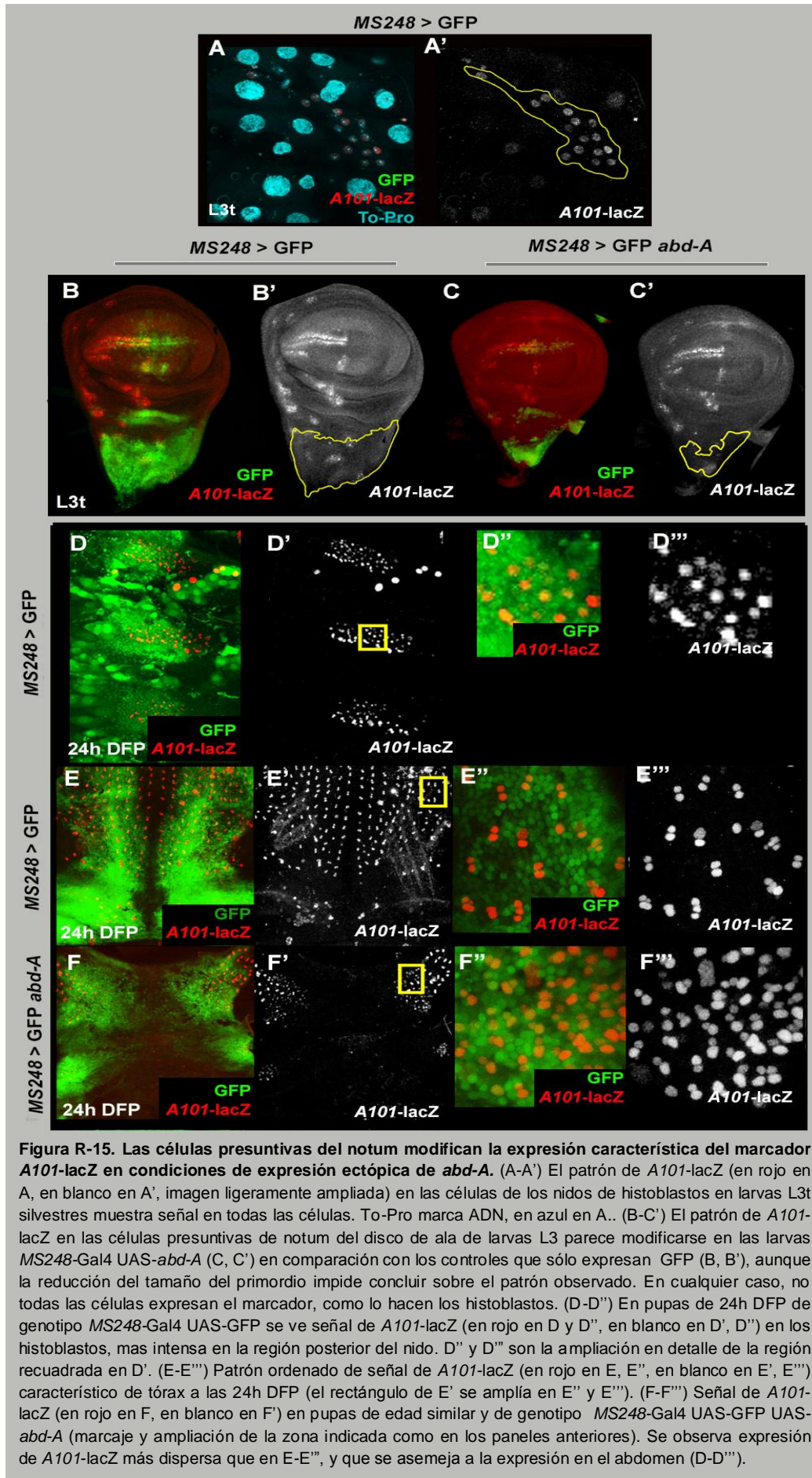
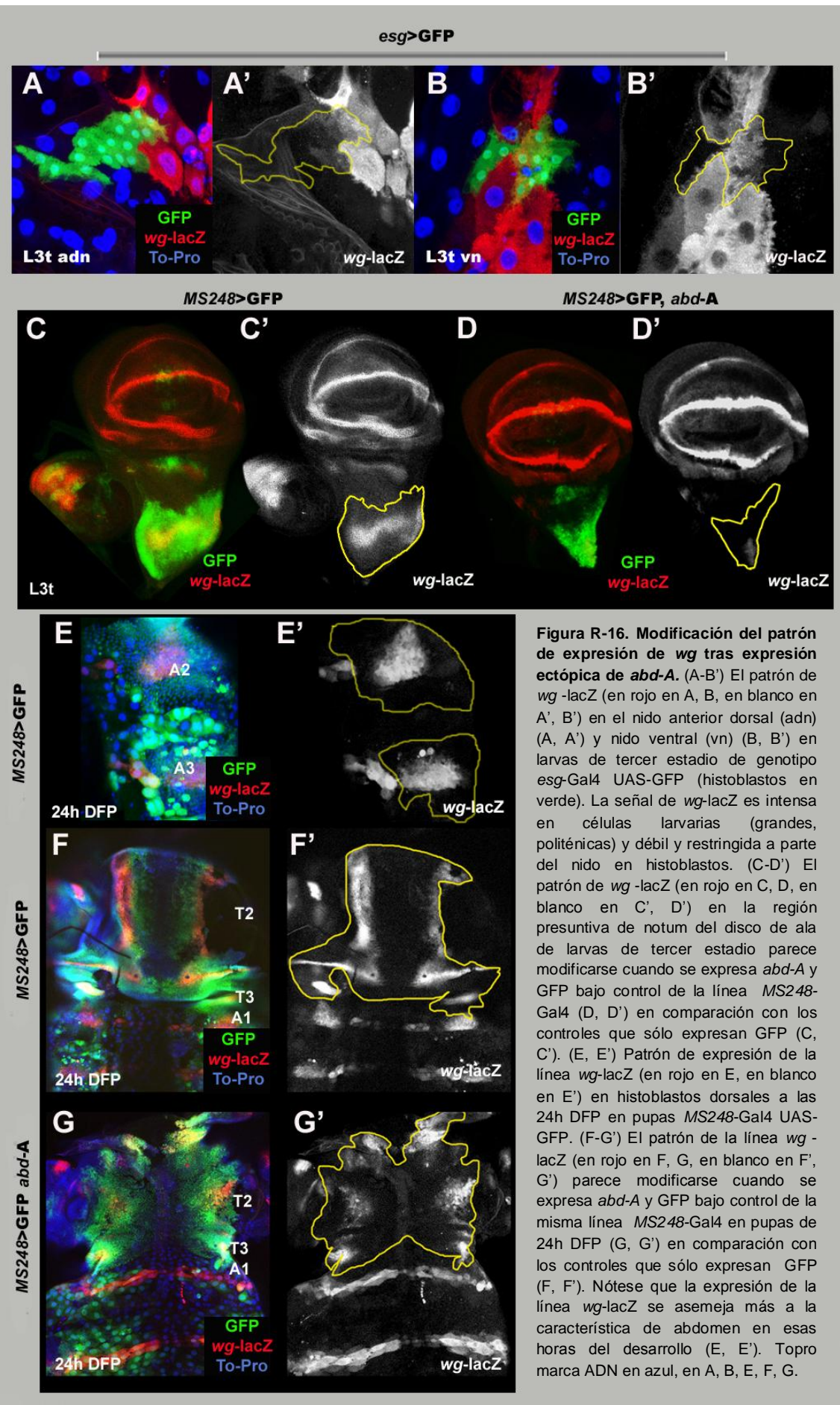


Figura R-15. Las células presuntivas del notum modifican la expresión característica del marcador A101-lacZ en condiciones de expresión ectópica de *abd-A*. (A-A') El patrón de A101-lacZ (en rojo en A, en blanco en A', imagen ligeramente ampliada) en las células de los nidos de histoblastos en larvas L3t silvestres muestra señal en todas las células. To-Pro marca ADN, en azul en A.. (B-C') El patrón de A101-lacZ en las células presuntivas de notum del disco de ala de larvas L3 parece modificarse en las larvas MS248-Gal4 UAS-*abd-A* (C, C') en comparación con los controles que sólo expresan GFP (B, B'), aunque la reducción del tamaño del primordio impide concluir sobre el patrón observado. En cualquier caso, no todas las células expresan el marcador, como lo hacen los histoblastos. (D-D'') En pupas de 24h DFP de genotipo MS248-Gal4 UAS-GFP se ve señal de A101-lacZ (en rojo en D y D'', en blanco en D', D'') en los histoblastos, mas intensa en la región posterior del nido. D'' y D''' son la ampliación en detalle de la región recuadrada en D'. (E-E'') Patrón ordenado de señal de A101-lacZ (en rojo en E, E'', en blanco en E', E'') característico de tórax a las 24h DFP (el rectángulo de E' se amplía en E'' y E'''). (F-F'') Señal de A101-lacZ (en rojo en F, en blanco en F') en pupas de edad similar y de genotipo MS248-Gal4 UAS-GFP UAS-*abd-A* (marcaje y ampliación de la zona indicada como en los paneles anteriores). Se observa expresión de A101-lacZ más dispersa que en E-E'', y que se asemeja a la expresión en el abdomen (D-D''').



La detección del patrón de expresión de *wg* en el disco de ala mutante presenta similares problemas a los de *eyg* o *A101-lacZ*. Se observa expresión de *wg* (Fig. R-16 D, D'), pero es difícil concluir si el patrón varía respecto al silvestre de la región presuntiva de notum (Fig. R-16 C, C') o si se parece al patrón silvestre de los nidos de histoblastos en el periodo larvario (Fig. R-16 A-B'), aunque parece más bien que la señal disminuye sustancialmente. A las 24h DFP, el patrón abdominal (Fig. R-16 E, E') y torácico Fig. R-16 F, F') de pupas *wg-lacZ* silvestres es claramente diferente y la expresión de *abd-A* parece cambiar el patrón torácico a un patrón más acorde con el patrón abdominal en esas horas del desarrollo (Fig. R-16 G, G').

Los experimentos realizados para estudiar cuando se produce la modificación del patrón torácico al expresar *abd-A* nos han proporcionado respuestas solo parcialmente concluyentes. Por una parte, no se adopta el patrón de expresión abdominal de *neu-lacZ* en periodo larvario (Fig. R-15), pero por otra parte el patrón torácico de *eyg* y *wg* no parece persistir en este mismo periodo (Figs. R-14 y R-16). Es claro en los tres casos estudiados (*omb*, *neu*, *wg*) que en el periodo pupal se produce una completa transformación del patrón torácico en abdominal (Figs. R-13, R-15 y R-16). Para definir mejor lo que ocurre en el periodo larvario se requerirán nuevos experimentos y mejores marcadores.

1.2 Expresión ectópica de *Ubx*

Ubx es el gen homeótico que controla la identidad del PS5 (T2p-T3a) y PS6 (T3p-A1a), es decir, el mesotórax posterior (T2p), el metatórax (T3) y el primer segmento abdominal (A1) (Lewis, 1963; Lewis, 1978; Morata y García-Bellido, 1976; Morata y Kerridge, 1981; Casanova y col., 1985). Por tanto, este gen se expresa y requiere tanto en zona de discos (halterio, pata 3, pata 2p) como en abdomen (A1). Nosotros recurrimos de nuevo al uso de la línea *MS248-Gal4* para inducir su expresión ectópica en el territorio presuntivo de notum, centrándonos en particular en el fenotipo resultante en el T2. Cómo se puede observar en la figura R-17, el tejido tanto del T2 como del T3 muestran una transformación clara hacia tejido de abdomen tipo A1 (detalle en Fig. R-17 B'). Es posible que las conclusiones que hemos obtenido respecto a *abd-A* hasta ahora se apliquen igualmente a *Ubx*. Sin embargo, debido al papel de este gen en los dos tipos de primordios (discos y abdomen), hemos centrado nuestro trabajo en la función de *abd-A* en control de la división celular y formación de patrón.

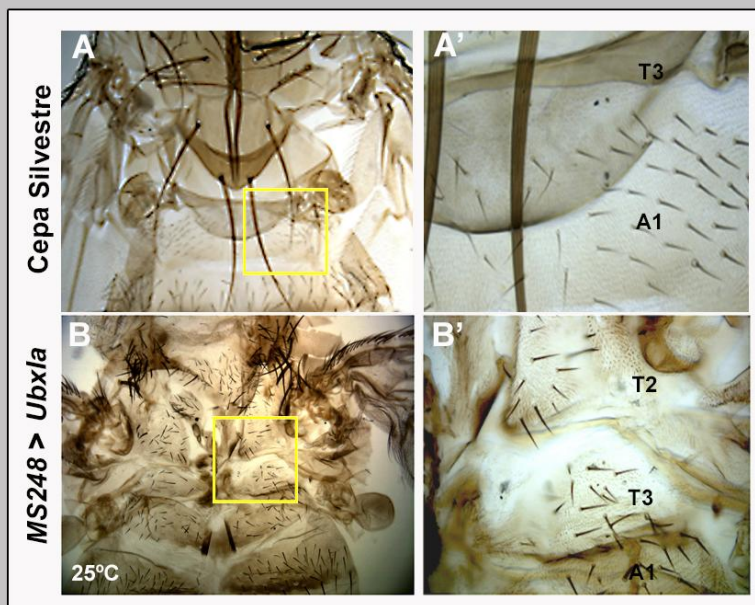


Fig. R-17. Fenotipos adultos de expresión ectópica de *Ubx*. (A-A') Fenotipo cuticular torácico adulto de una mosca de genotipo silvestre. La región recuadrada del segmento abdominal A1 se amplía en A'. (B-B') Fenotipo cuticular torácico adulto de una mosca de genotipo *MS248-Gal4 UAS-Ubx/la* crecida a 25°C. Se observa la transformación del tórax a abdomen tipo A1. La región recuadrada del segmento torácico T2-T3 se amplía en B' y muestra que la disposición y tamaño de cerdas se asemeja más al A1 que al T2 (comparar con el fenotipo silvestre de T2 en Figs. R-2 y R-3 y con el A1 mostrado en A').

2. Transformación de tejido presuntivo de abdomen en tejido torácico

2.1 Papel de *abd-A* en el desarrollo de los nidos de histoblastos

Tal y como hemos demostrado, *abd-A* es suficiente para inducir la diferenciación de tejido abdominal adulto sin cambiar el ritmo proliferativo. Quisimos comprobar si se podía producir la conversión opuesta, de abdomen a tórax, y si esta implicaba variaciones en la proliferación celular. Sin embargo, la falta de *abd-A* transforma los segmentos A2-A7 hacia A1, no hacia tórax, siendo más fuerte la transformación en los segmentos A2-A4 (Sánchez-Herrero y col., 1985; Tiong y col., 1985). Para contestar nuestra pregunta sería necesario estudiar el efecto de la falta de función de *Ubx* en el A1, (o de *Ubx* y *abd-A* en A1-A4) ya que es este gen Hox el que distingue el desarrollo del A1 frente al destino T2 (Lewis, 1963; 1978). Este análisis se desarrolla en los apartados siguientes. Sin embargo en un trabajo reciente (Singh y Mishra, 2014) se sostiene que la reducción de la expresión de *abd-A* mediante el uso de un ARN de interferencia (ARNi) causa una reducción en el número de divisiones de los histoblastos durante la primera fase proliferativa, y produce como consecuencia problemas severos en el desarrollo de la cutícula adulta, dando lugar a individuos sin cutícula abdominal diferenciada. Es por ello que decidimos estudiar y describir primero en este apartado nuestros resultados de la falta de función de *abd-A*.

2.1.1 Silenciamiento de la expresión del gen *abd-A* mediante el uso de ARN de interferencia.

Para inducir el silenciamiento de la expresión de *abd-A*, recurrimos al uso del ARNi para este gen expresado mediante la línea *esg-Gal* (con expresión en histoblastos) tal y como se lleva a cabo en el trabajo citado (Singh y Mishra, 2014). Los fenotipos más severos que nosotros pudimos observar, con el sistema *Gal4/Gal80^{ts}* y manteniendo las puestas a 29°C tras pasar tres días del desarrollo a 17°C (momento en el cual empezamos a observar la aparición de las primeras larvas; individuos *esg-Gal4 UAS-GFP/UAS-abd-A ARNi; tub-Gal80^{ts}*), son los de fusión dorsal incompleta de los hemisegmentos abdominales (Fig. R-18 B, el fenotipo silvestre en R-18 A). No obstante, los adultos crecidos en estas condiciones no mostraban los fenotipos de cutícula incompleta descritos recientemente (Singh y Mishra, 2014), sino que presentaban la transformación parcial de los segmentos abdominales hacia el segmento A1, reconocida por el patrón característicos de quetas de este segmento y la despigmentación parcial en la región posterior de los terguitos (Fig. R-18 B, B' comparar con R-18 A, A'). Esta transformación, que concuerda con lo descrito previamente para la falta de *abd-A* (Sánchez-Herrero y col., 1985; Tiong y col., 1985), es más evidente en el segmento A2, ya que esta línea reduce su expresión durante el desarrollo pupal (Ninov y col., 2007) en segmentos posteriores a este, y más intensamente en los compartimentos posteriores, hasta la desaparición de la misma hacia la mitad del desarrollo pupal, según nuestras observaciones.

Decidimos igualmente comprobar qué podía estar ocurriendo con el desarrollo de los nidos en situaciones de falta de función de *abd-A*. La reducción de la expresión de *abd-A* en el genotipo y condiciones descritas anteriormente produce una morfología distinta de la silvestre en los histoblastos: mientras que en las larvas control (*esg-Gal4 UAS-GFP; tub-Gal80^{ts}*) los histoblastos presentan un contorno celular festoneado, detectado con un anticuerpo contra FasciclinIII (FasIII), que marca los contornos celulares (Snow y col., 1989) (Fig. R-18 C-C''), en el genotipo mutante observamos una pérdida del mismo, dando como resultado una morfología celular más poligonal o redondeada (Fig. R-18 D-D''). Sin embargo, el número de histoblastos presentes en los nichos mutantes no variaba (Fig. R-18 C''', D''').

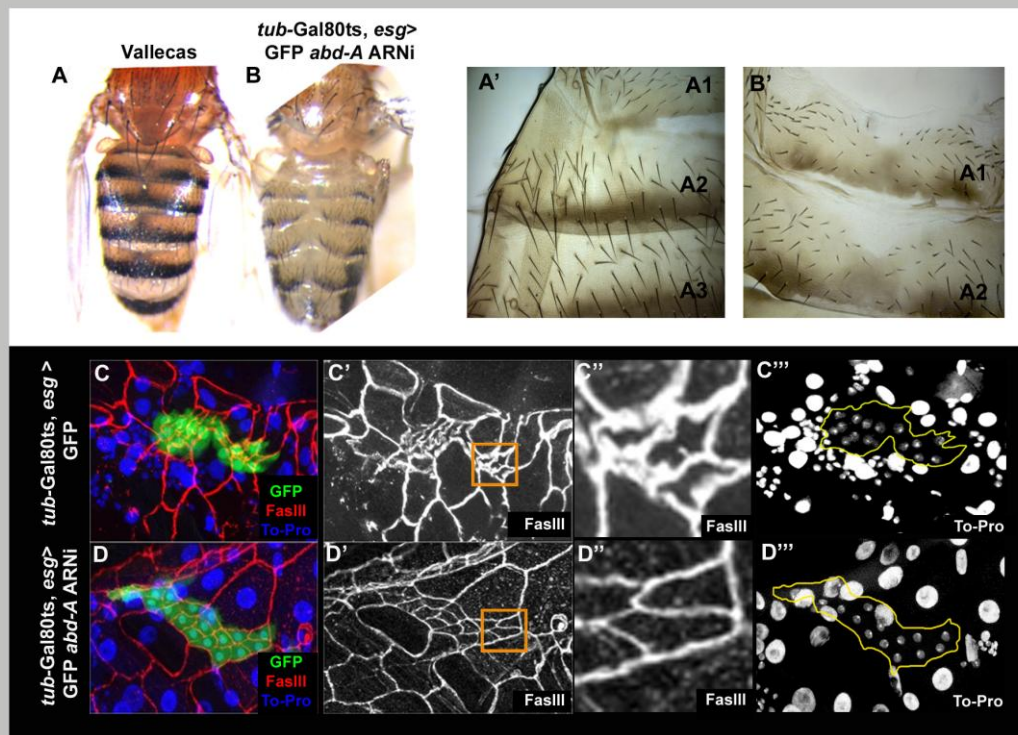
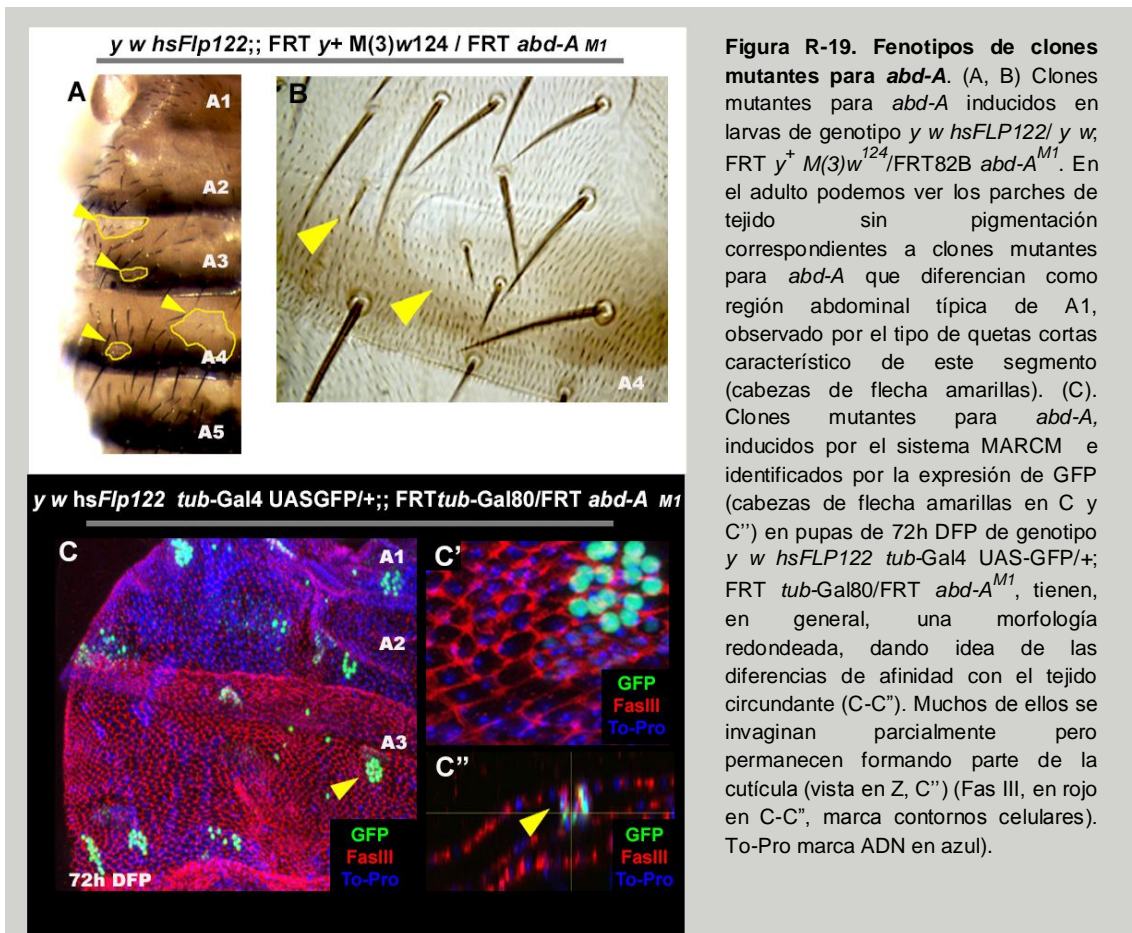


Figura R-18. Fenotipos abdominales en condiciones mutantes para *abd-A*. (A-B') Los adultos que expresan el ARNi para *abd-A* desde los primeros estadios larvarios usando la línea *esg-Gal4* (B) muestran, en los casos más severos, defectos de fusión de hemisegmentos (B, B'). Estos adultos, de genotipo *esg-Gal4* UAS-GFP/ UAS-*abd-A* ARNi; *tub-Gal80^{ts}* /+, presentan una transformación parcial hacia A1 en los segmentos A2-A7, siendo más evidente en el A2 (B, B'; la condición silvestre, cepa Vallecas, en A y A'). (C-D''') Los histoblastos de larvas del mismo genotipo mutante (en verde en D) modifican ligeramente su morfología, observada con anti-FasIII (en rojo en D, en blanco en D', D''), perdiendo el festoneado característico de estas células (D-D'') (comparar con larvas control *esg-Gal4* UAS-GFP; *tub-Gal80^{ts}* en C-C'). El número de células que componen el nido no se ve modificado (D''', el control en C'''; C' y D' son ampliaciones de las regiones recuadradas en C' y D', respectivamente). To-Pro marca ADN en azul en C, D, en blanco en C''' y D''').

2.1.2 Inducción de clones mutantes para *abd-A*.

Tras trabajar con el ARNi para *abd-A*, decidimos también comprobar los fenotipos obtenidos en estudios previos en experimentos de inducción clonal. El marcaje de clones mutantes nulos para *abd-A* en el adulto mediante la pérdida del marcador cuticular *yellow* en moscas de genotipo *y w^{hsFLP122} / y w ; FRT82B y⁺ M(3)w¹²⁴ / FRT82B abd-A^{M1}* nos permite observar (Fig. R-19 A, B) que los clones transforman, como se ha publicado (Sánchez-Herrero y col., 1985; Tiong y col., 1985), hacia A1. En pupas de 72h DFP, los clones mutantes inducidos por el sistema MARCM (Ver Material y Métodos) en L3t de genotipo *y w^{hsFLP122} tub-Gal4 UAS-GFP/+; FRT82B tub-Gal80 / FRT82B abd-A^{M1}*, e identificados por la expresión de GFP, presentan una tendencia a ser esféricos, a veces invaginándose en el tejido, sugiriendo una diferente afinidad con las células circundantes silvestres (Fig. R-19 C-C'). Resumiendo los datos obtenidos, nuestros resultados no avalan los problemas del desarrollo del abdomen que se observan en la publicación de Singh y Mishra, 2014, sino que corroboran los resultados previos publicados.



2.2 Función de *Ubx* en el desarrollo de los nidos de histoblastos

Para estudiar la transformación de abdomen a tórax y su posible efecto en proliferación celular, analizamos mutantes *Ubx*. La ausencia de *Ubx* transforma, dorsalmente, los halterios en alas y el metanotum (zona central dorsal del T3) en mesonotum (la correspondiente del T2) (Lewis, 1963; Lewis, 1978; Morata y García-Bellido, 1976). En el A1 la situación es más compleja: en larvas mutantes para *Ubx* se transforma este segmento en T2 (o PS6 a PS4, más bien); se ha descrito igualmente en estos mutantes la transformación de los nidos de histoblastos de A1 en invaginaciones de la epidermis, como reminiscentes de sacos epiteliales, que los autores asumen corresponden a disco de pata en ventral y a veces disco de ala en dorsal (Frayne y Sato, 1991). En el adulto, sin embargo, la reducción de *Ubx* en el A1, en mutantes *bithoraxoid*, produce dorsalmente la falta de terguito (Lewis, 1963; Bender y col., 1985), y los clones mutantes para *Ubx* no se recobran en el tejido adulto de este segmento (Morata y García-Bellido, 1976). Decidimos comprobar que ocurría en los histoblastos del A1 cuando se reducía la expresión de *Ubx* mediante el uso de ARN de interferencia (ARNi) o mediante la inducción de clones mutantes para *Ubx*.

2.2.1 Inducción de clones mutantes para *Ubx*.

Como acabamos de mencionar, los clones mutantes para *Ubx* no se recuperaban en el A1 de adultos. La hipótesis barajada en este estudio para explicarlo era que estos clones debían estar siendo eliminados o no podían crecer y diferenciarse (Morata y García-Bellido, 1976). Quisimos comprobar que era lo que estaba sucediendo, así que indujimos clones *Ubx*^{6.28} en el tejido abdominal. Para inducir clones de recombinación mitótica hay que esperar a que las células se dividan al menos una vez, y la división de los histoblastos no tiene lugar hasta el principio del periodo pupal, por lo que se indujeron clones en distintos momentos durante el periodo larvario, en particular en larvas próximas a la entrada en pupación.

La inducción de clones *Ubx*^{6.28} nos permitió recuperar algunos clones en el A1, que presentaban características típicas de tejido torácico. Así, en las imágenes de la Figura R-20 A, A' podemos ver como uno de estos clones muestra una queta y tricomas diferentes (más largos) a los característicos del A1 u otros segmentos abdominales, pero parecido a los del T2 dorsal. Es posible, por tanto, recuperar estos clones, y la diferencia con los experimentos anteriores, en los que no aparecían, puede deberse al distinto método de inducción y sus consecuencias (ver Discusión). Sin embargo, sólo la mitad de los adultos recuperados mostraban algún clon fenotípicamente reconocible, por lo que decidimos comprobar si la mayor parte de ellos estaban siendo eliminados del tejido. Cuando miramos en pupas tardías (96h DFP) encontramos clones marcados por GFP en el tejido, pero que en la mayor parte de las ocasiones se quedaban por debajo de la superficie cuticular (Fig. R-20 B-B'''). Para observar la posible invaginación de los clones mutantes, seleccionamos como tiempo de disección 96h DFP como un tiempo intermedio entre las 72h DFP, cuando aún observábamos varios clones marcados con GFP, y por tanto mutantes para *Ubx*, y el estadio adulto, donde recuperábamos pocos casos). Como se puede apreciar en la Figura R-20 B, los clones mostraban una morfología redondeada en el A1, sugiriendo diferencias de afinidad con el tejido circundante, mientras que los clones en el A2 presentaban una morfología irregular y se encontraban en mayor número y dispuestos en superficie (Fig. R-20 B). Esto último era de esperar ya que *Ubx* no se expresa en A2 en pupa (Kopp y Duncan, 2002; Singh y Mishra, 2014).

Estudiamos también el comportamiento de las células mutantes para *Ubx*^{6.28} en A1 en experimentos *in vivo*. Sin embargo, estos experimentos no nos permitieron extraer conclusiones claras acerca del comportamiento del tejido mutante. Una de nuestras limitaciones técnicas fue el uso de los marcadores seleccionados para hacer el seguimiento celular. Estos marcadores presentaban una expresión muy intensa en tipos celulares subyacentes al tejido cuticular -como serían macrófagos, células del cuerpo graso y músculo- por lo que se dificultó el seguimiento del tejido de interés (Película 1; Fig. R-21. Ver Material y Métodos Fig. M-2). Por ello, decidimos también otra combinación génica (MARCM Ver Material y Métodos Fig. M-3) para la generación de clones que nos permitiera el seguimiento clonal de una forma más sencilla. Por otra parte, en algunos casos, parecía observarse una disgregación del tejido que componía el clon mutante (Película 1; Fig. R-21 A; 48-58h DFP), mientras que en otros, a pesar de ser capaces de identificar el tejido *Ubx* mutante, no pudimos observar ningún comportamiento reseñable que indicase una eliminación de las células que lo componen, o un crecimiento del tejido (proliferación celular), en las horas observadas del desarrollo (Película 2. Ver Fig. R-21 B; 72h-80h DFP). Quizás los clones deban ser analizados en horas posteriores para ver, por ejemplo, si siguen un patrón de proliferación característico de disco imaginal.

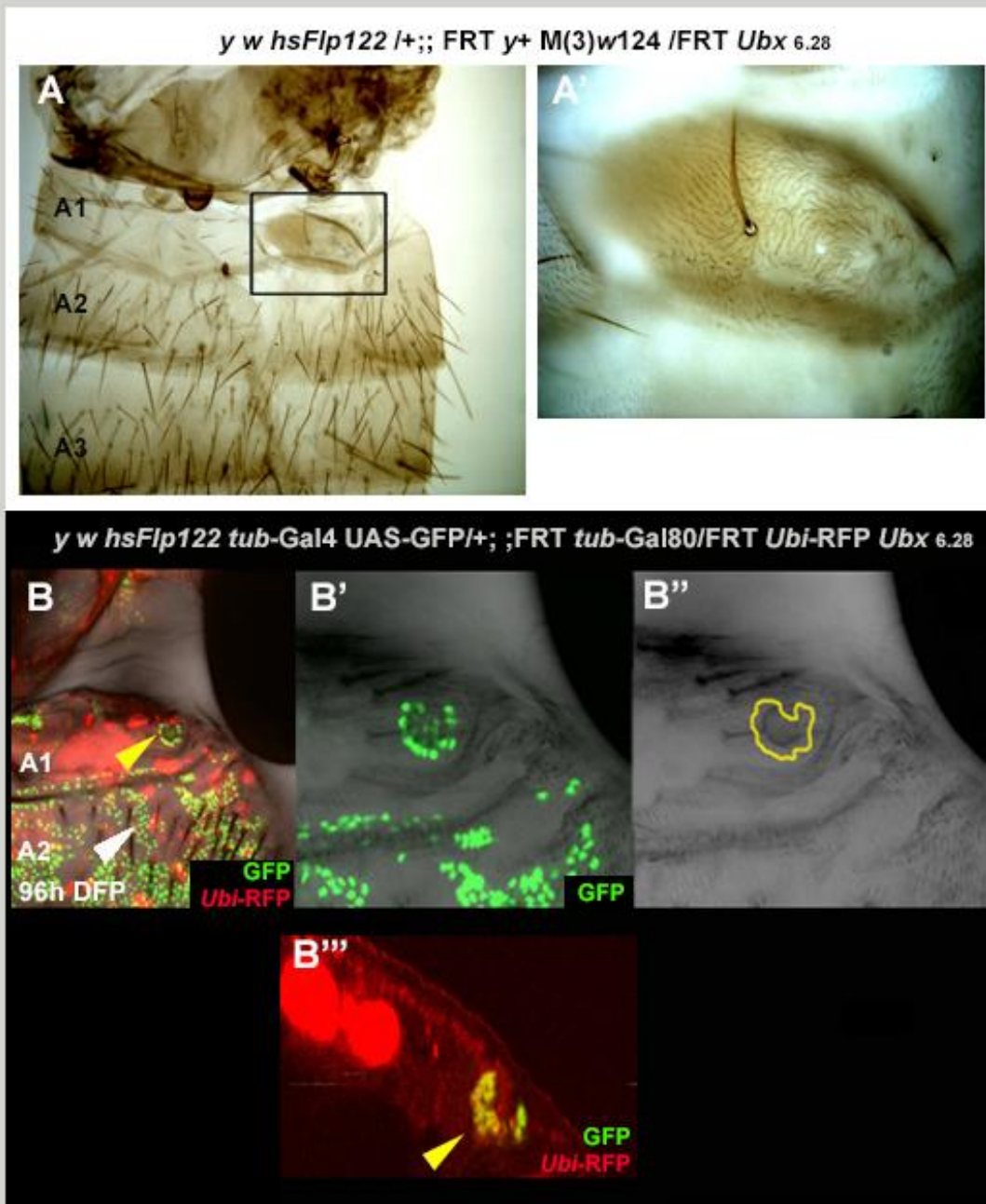


Figura R-20. Los clones mutantes para *Ubx* transforman el A1 en estructura torácica. (A) Parte anterior del abdomen de un adulto con un clon mutante para *Ubx^{6.28}* en el segmento A1, marcado con el marcador cuticular *y*, e indicado con un recuadro. (A') La ampliación muestra una queta más larga que las típicas del patrón abdominal del segmento A1 y tricomas también más largos y con forma de hoz que se asemejan a los correspondientes a la zona torácica. (B) Los clones *Ubx*, marcados con GFP, suelen ser redondeados en el segmento A1 (flecha amarilla), sugiriendo una diferente afinidad con las células de alrededor, pero no en el segmento A2 o posteriores (flecha blanca). *Ubi-RFP*, en rojo, marca los núcleos en todas las células menos en clon gemelo, aunque la visualización del mismo no fue posible en este tejido. (B'-B''') Se muestran ampliaciones del clon en A1, señalado en B con la flecha amarilla, con la superficie cuticular mostrada en campo claro (B', B''), donde se visualiza una morfología aberrante del tejido debido a la invaginación del mismo, observada mejor en el corte en Z (B''').

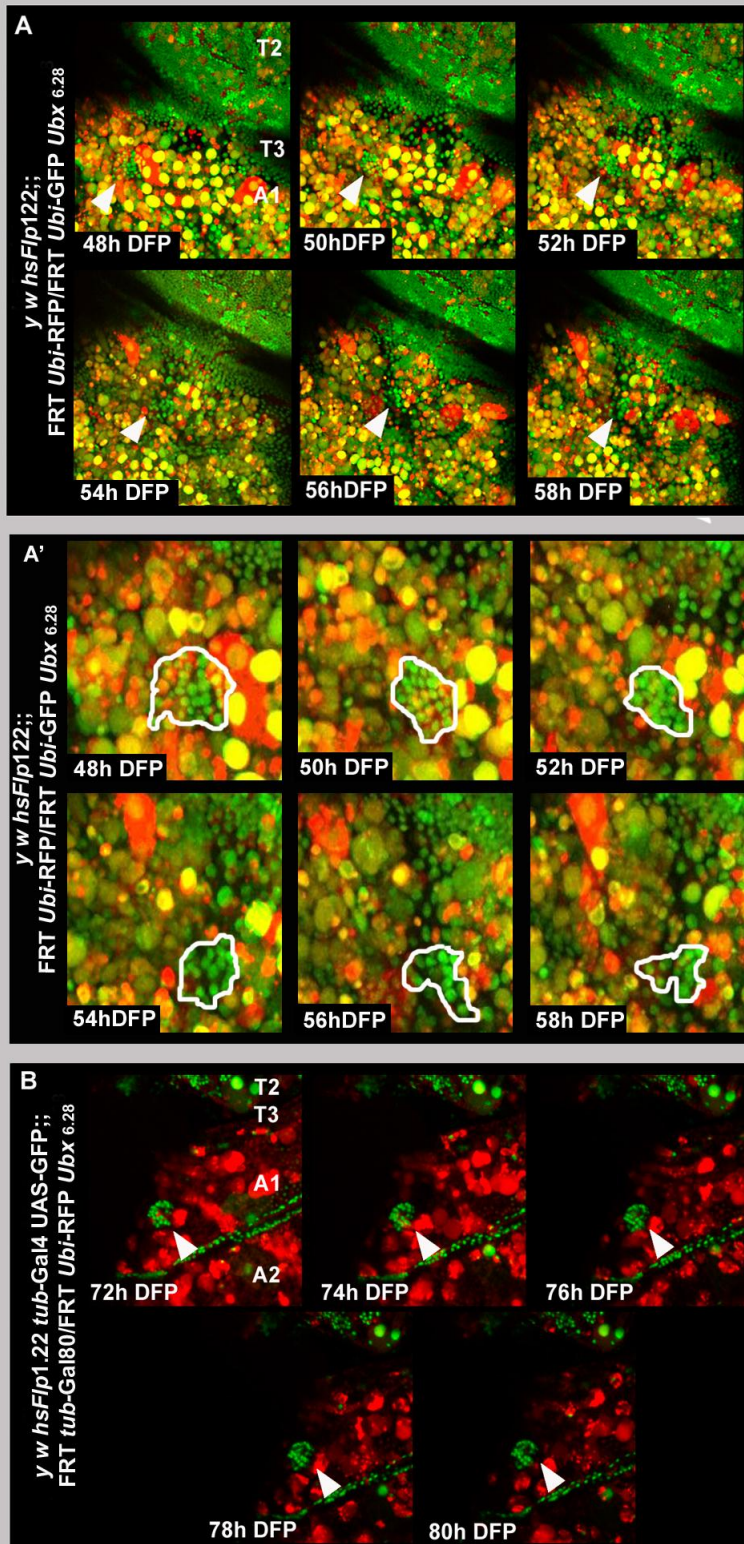


Figura R-21. Los clones mutantes para *Ubx* tienden a ser eliminados durante el periodo pupal.

(A) Secuencia de imágenes correspondientes a una grabación *in vivo* durante 10h, entre las 48-58h DFP, tomadas a intervalos de dos horas, de un clon mutante para *Ubx* en el A1. Las flechas blancas indican la progresión del clon mutante marcado por doble dosis de GFP (verde) y ausencia de RFP (rojo) en individuos de genotipo *y w hsFLP122;; FRT Ubi-RFP/FRT Ubi-GFP Ubx^{6.28}*. (A') Detalles de la región señalada con flechas blancas en A. El clon está delimitado por un contorno blanco. Nótese como las células del clon parecen dispersarse. (B) Secuencia de imágenes correspondientes a una grabación *in vivo* durante 8h, entre las 72-80h DFP, tomadas a intervalos de dos horas, de un clon mutante para *Ubx* en el A1. Las flechas blancas indican la progresión del clon marcado por GFP (verde) y doble dosis de RFP (rojo) en individuos de genotipo *y w hsFLP122 tub-Gal4 UAS-GFP; FRT tub-Gal80 /FRT Ubi-RFP Ubx^{6.28}*. Nótese como las células del clon se mantienen agregadas formando un clon redondeado en el que apenas hay movimientos celulares.

2.2.2 Inducción de clones mutantes para el C-BX

Para estudiar las transformaciones a tórax en todos los segmentos abdominales decidimos estudiar qué ocurría con los nidos de histoblastos cuando inducíamos clones mutantes para el BX-C. Para ello, hicimos uso del triple mutante *Ubx*¹ *abd-A*^{D24} *Abd-B*^{D18} (Hopmann y col., 1995). Sin embargo, no conseguimos recuperar clones en el adulto, aunque se ha demostrado que algunos clones mutantes para estos tres genes (usando diferentes alelos) son capaces de diferenciarse en el adulto, dando lugar a transformaciones totales o parciales (según el segmento en que se forman) a A1 (Casanova y col., 1987). Por tanto, quisimos saber si los clones estaban siendo eliminados, quizás, al igual que para clones mutantes para *Ubx*, debido a que se invaginaban y permanecían en el tejido por debajo de la cutícula. Tras la inducción de los clones y su observación a las 72h DFP vimos que en cualquier segmento abdominal estos clones presentaban una morfología redondeada debido a las diferencias de afinidad que presentaban con el tejido circundante, al igual que ocurría con los clones mutantes para *Ubx* o *abd-A*. Tinciones con anticuerpos contra las proteínas *Ubx* y *Abd-A* mostraban que no se estaban expresando en los clones (Fig. R-22 A-C', y no mostrado). En las imágenes de la Figura R-22 se puede apreciar que al menos en los clones inducidos en A1 estos están comenzando a invaginarse en el momento de observación (Fig. R-22 B, B').

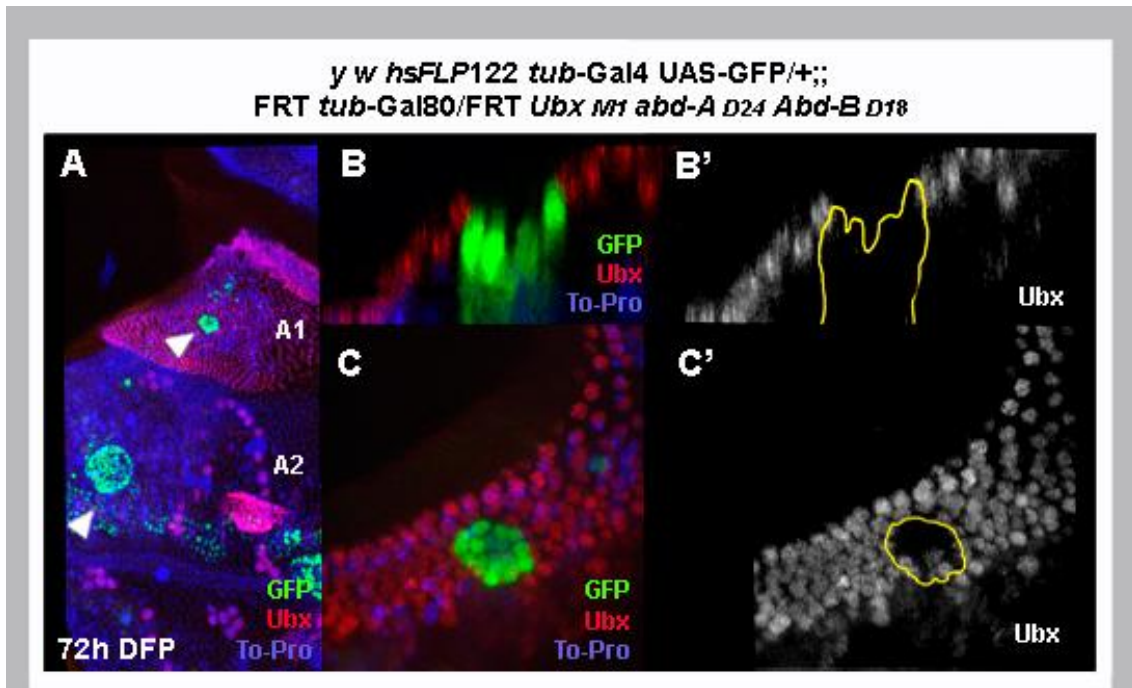


Figura R-22. Los clones triples mutantes para *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* presentan diferencias de afinidad con el tejido adyacente y se invaginan en pupa tardía. (A-C') Clones mutantes para *Ubx*¹ *abd-A*^{D24} *Abd-B*^{D18}, marcados con GFP (verde en A, B, C o delimitados por una línea amarilla en B' y C'). La flecha blanca superior en A señala el clon ampliado en B-C'. La ausencia de expresión de *Ubx* se marca en rojo en A, B, C o en gris en B', C'. Algunas células parecen expresar *Ubx* debido a la proyección en Z de los diferentes planos en C, C', pero en la visión en el eje Z se observa que no es así (B, B'). La flecha blanca inferior en A muestra un clon en el segmento A2, de morfología también redondeada.

2.2.3 Silenciamiento de la expresión del gen *Ubx* mediante el uso de ARN de interferencia.

Como observamos en los clones *Ubx* (Fig. R-20), el tejido que consigue diferenciarse en el adulto, lo hace como tejido torácico, por lo que quisimos saber si el comportamiento proliferativo de los histoblastos del A1, fundamentalmente durante el periodo larvario, se estaba viendo modificado, es decir, si la falta de *Ubx* pudiera hacer que los histoblastos se dividieran

como células de disco de ala. Para ello procedimos, igual que en el caso de *abd-A*, a hacer uso de la línea *esg-Gal4* para dirigir la expresión de un ARN de interferencia (ARNi) de *Ubx* (Monier y col., 2005) en los histoblastos. La construcción ARNi que usamos está recombinada, para una mayor disminución de la expresión del gen, con la deficiencia 109 (Df109 o DfUbx¹⁰⁹) (Lewis, 1978), que descubre las regiones génicas ocupadas por los genes *Ubx* y *abd-A*.

Con el sistema Gal4/Ga80^{ts} inhibimos la expresión de *Ubx* a partir del comienzo del periodo larvario (tras 3 días a 17°C pasamos las larvas a 29°C; individuos *tub-gal80^{ts}*; *esg-Gal4* UAS-GFP; UAS-*Ubx* ARNi Df109/+) y observamos los adultos obtenidos. Estos mostraban, por una parte, una clara transformación del segmento T3 hacia T2, incluyendo la de halterios en alas, de acuerdo con lo ya publicado (Lewis, 1963; Lewis, 1978; Morata y García-Bellido, 1976). En el segmento A1 se observaba una reducción significativa de este segmento (Fig. R-23), como resultado quizás de la no expansión de las células del nido durante el periodo pupal, apuntando a una función de este gen en dicho periodo. También se ve en la Figura, mostrado en detalle en A'', una porción de tejido de A1 que se encuentra situado por debajo del tejido propio del A2, y que presenta características intermedias a lo que podría ser T2 y A1, ya que como se observa las quetas que permanecen se asemejan a las de A1, aunque parecen algo más grandes, pero los tricomas, a pesar de no ser tipo notum, difieren de los típicos de A1 (parecen tener una disposición diferente). Esto podría sugerir que *Ubx* no está siendo completamente eliminado con la inducción de la expresión del ARNi en estas condiciones.

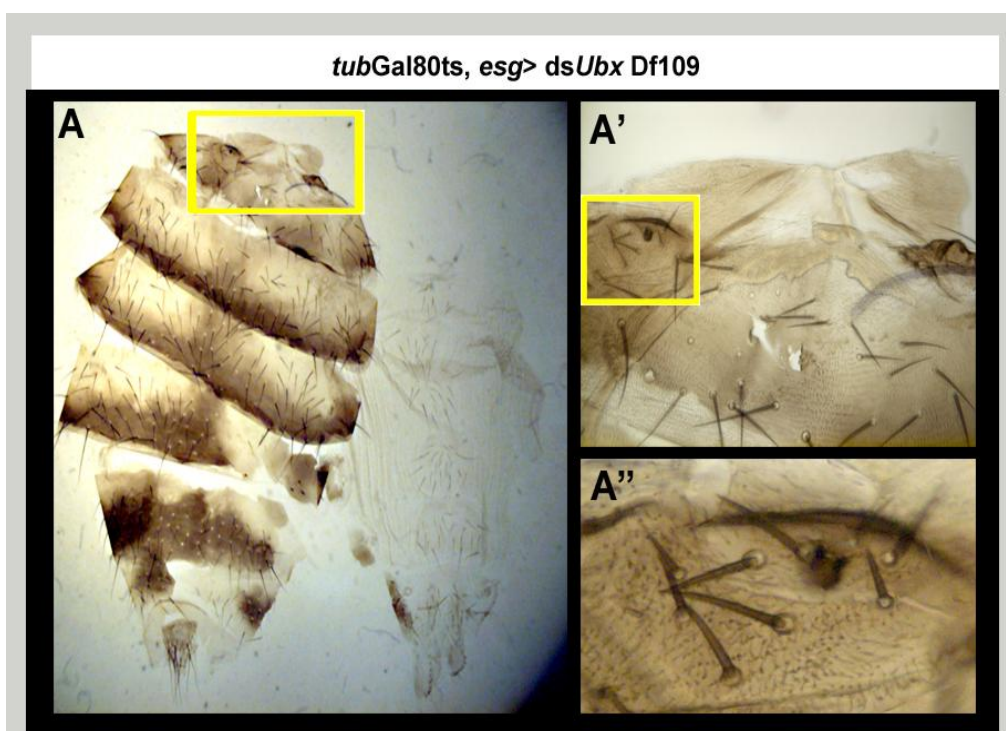


Figura R-23. Defectos en el abdomen cuando se induce un silenciamiento condicional de *Ubx*. (A-A'') Los adultos que expresan el ARNi para *Ubx* desde los primeros estadios larvarios usando la línea *esg-Gal4* muestran defectos en la correcta formación del segmento A1, quedando este segmento muy reducido y en la mayoría de los casos situado por debajo del A2 (A', ampliación del recuadro en A). (A'') Ampliación de porción de tejido remanente de A1 indicada con un recuadro en A'. El tejido parece presentar características intermedias a lo que podría ser T2 y A1 (tamaño de quetas y tricomas diferente a los característicos de A1).

Analizamos también el fenotipo en los nidos del segmento A1 de larvas L3t induciendo el silenciamiento durante todo el periodo larvario haciendo uso del sistema Gal4/Gal80^{ts} (larvas mantenidas a 29°C durante 4 días tras 3 días a 17°C) y comprobamos que el fenotipo encontrado no altera el número de células que componen los nidos, aunque estas células ven modificada ligeramente su morfología, perdiendo el festoneado característico de su condición silvestre (Fig. R-24 B, B', el control en A, A'), presentando además ligeras variaciones aparentes en la condensación de la cromatina de sus núcleos, inferido a partir de la variabilidad que presentan en su marcaje con To-Pro (Fig. R-24 B, B'', el control en A, A''). Debido a que no observamos variaciones en el número de histoblastos que componían los nidos del A1, donde esperaríamos que hubiera más células si el tejido se dividiera como disco, decidimos probar a silenciar este gen desde etapas más tempranas, donde podría estarse determinando el comportamiento proliferativo de estas células. Así decidimos comprobar que ocurría con los nidos del A1 cuando el silenciamiento de la expresión de *Ubx* se producía desde el momento de la expresión de la línea *esg-Gal4* en el embrión, manteniendo las puestas a 25°C (sin el sistema Gal4/Gal80^{ts}). En este caso, los individuos en los que inducíamos el silenciamiento presentaban una pérdida del festoneado al igual que ocurría cuando era silenciado sólo en larva (Fig. R-24 C, C', D, D'; comparar con los controles en R-24 A, A') y los núcleos de la mayoría de las células del nido se teñían de forma variable con To-Pro al igual que en experimento anterior (Fig. R-24 C'' y D'', comparar con controles en A''). En la mayoría de casos, mostraban además un tamaño nuclear intermedio entre el propio de las células del nido y el de las CELs (Fig. R-24 C'', D''). En los casos más severos, encontramos además una reducción en el número de células que componen el nido (Fig. R-24 D, D'' comprar con A, A'').

Por consiguiente, una diferencia, clara entre inactivar *Ubx* durante el desarrollo embrionario y larvario o solo en este último es que en el primer caso los histoblastos varían su morfología celular y la apariencia de sus núcleos, además de observar en algunas larvas una reducción en el número de histoblastos. Sin embargo, consideramos importante es que en ninguno de los dos tipos de experimentos se observa, un aumento en el número de histoblastos, es decir, no muestran características de destino torácico durante el periodo larvario, al menos en lo referente a la proliferación celular. El número de células abdominales debería ser mayor que el silvestre si el tejido se estuviera comportando como células del disco imaginal de ala y dividiéndose acordemente.

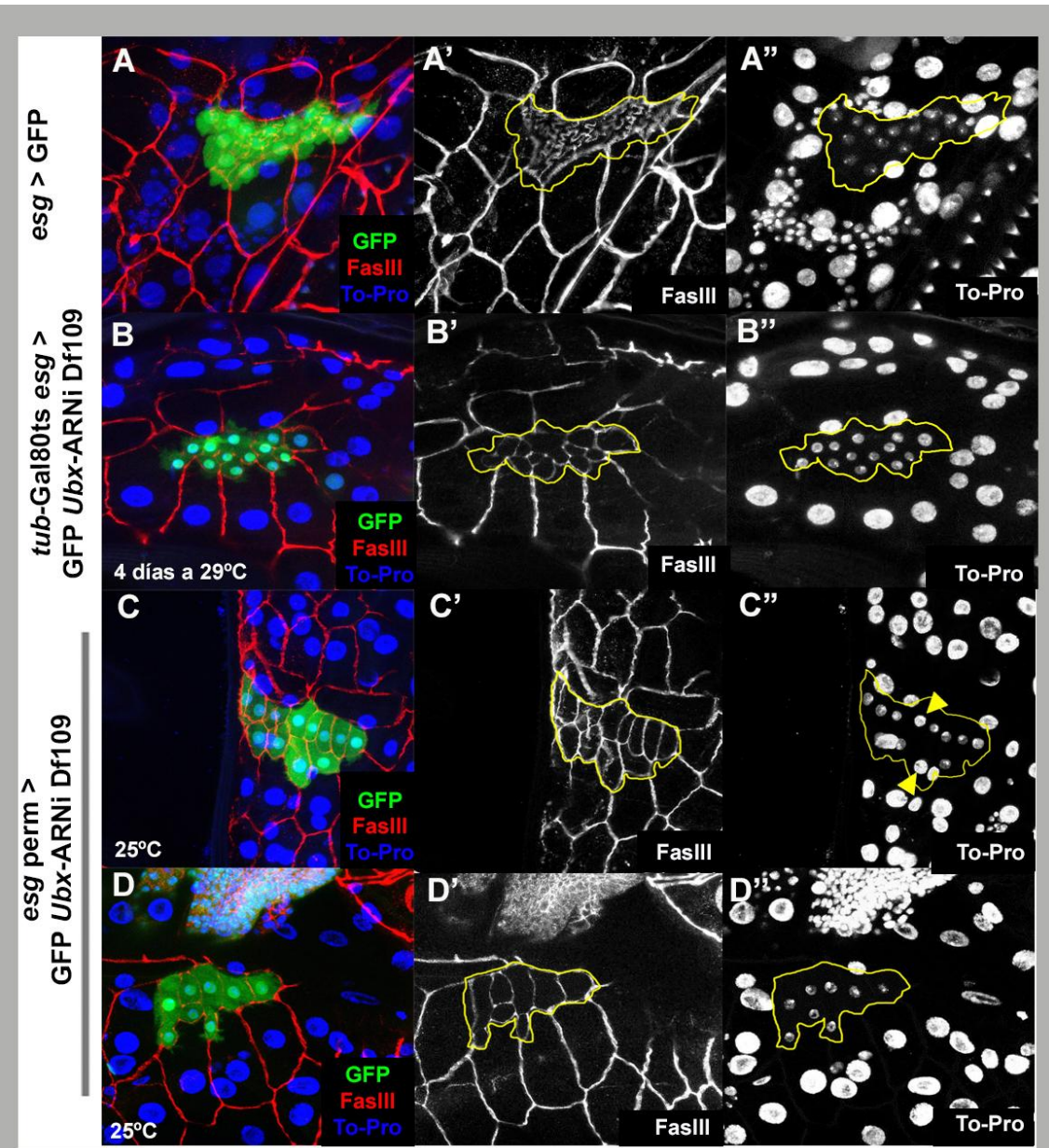


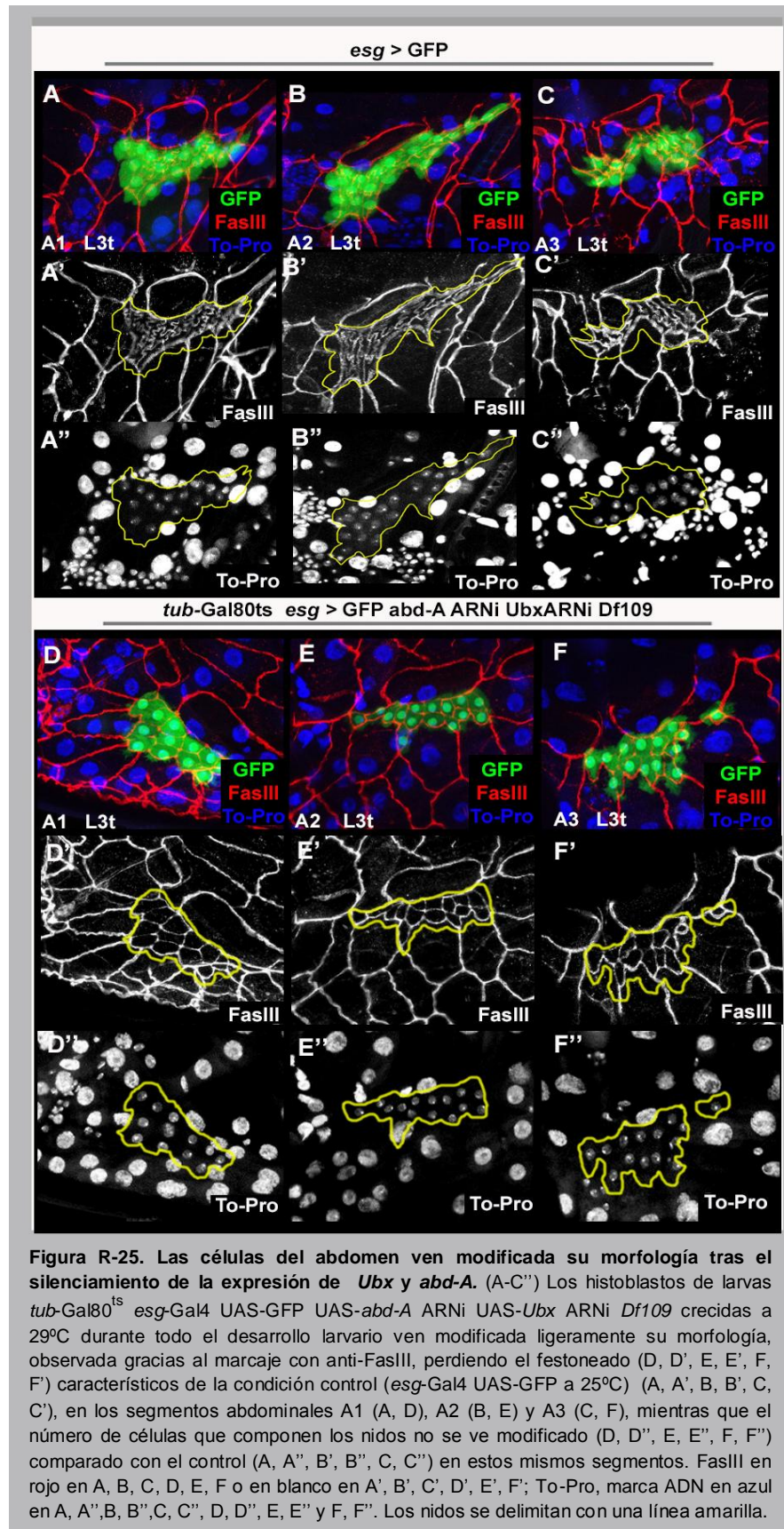
Figura R-24 . Las células del abdomen ven modificada su morfología en condiciones mutantes para *Ubx*. (A-A'') Histoblastos del A1 de larvas de tercer estadio tardío, L3t, de genotipo *esg-Gal4 UAS-GFP* cuyo contorno celular ha sido marcado con anti-FasIII (en rojo en A, en blanco en A') y cuyos nucleos se marcan con To-Pro (en azul en A, en blanco en A''). (B-B'') Los histoblastos del A1 de larvas *esg-Gal4 UAS-GFP; UAS-Ubx ARNi Df109/tub-Gal80^{ts}* crecidas a 29°C durante 4 días ven modificada ligeramente su morfología, perdiendo el festoneado característico de estas células, observado gracias al marcaje de su contorno celular con anti-FasIII (en rojo en B, en blanco en B' ; compárese con A, A'), pero no el número de células que componen el nido, observado gracias al marcaje nuclear con To-Pro (en azul en B, en blanco en B''), en comparación con la condición silvestre (A, A''). (C-D'') Los histoblastos de larvas *act> y⁺ >Gal4, esg-Gal4 UAS-GFP; UAS-Ubx ARNi Df109/ UAS-FLP* crecidas a 25°C durante todo el desarrollo modifican ligeramente su morfología, perdiendo el festoneado característico de estas células, observado gracias al marcaje de su contorno celular con anti-FasIII (en rojo en C, D en blanco en C', D' ; compárese de nuevo con A, A') y aparecen cambios variables en el marcaje de los núcleos (C-C''), mostrando también diferencias de tamaño nuclear variables (flechas amarillas en C'', observado gracias al marcaje del ADN con To-Pro, en azul en C, D, en blanco en C'', D''). El número de células que componen el nido se ve modificado en los casos más severos (D, D''). Los nidos se delimitan con una línea amarilla.

2.2.4 Silenciamiento de la expresión simultánea de los genes *Ubx* y *abd-A* mediante el uso de ARN de interferencia.

Para observar mejor los cambios en la morfología de los nidos inactivamos simultáneamente *Ubx* y *abd-A* únicamente durante el periodo larvario. La epidermis de las larvas de estadio L3t no mostraba variaciones en el número de histoblastos que conformaban los nidos pero sí se veía modificada la morfología de su contorno celular (Fig. R-25 D, D', E, E', F, F', el control en A, A', B, B' y C, C'), al igual que en los experimentos anteriores (Fig. R-18 y R-24). Sin embargo, y en relación a nuestro análisis del control de la división celular, es de destacar de nuevo que no hay aumento en el número de histoblastos (no se comportan en este aspecto como células de disco imaginal).

De los experimentos de falta de función de *Ubx* y *abd-A* podemos extraer las siguientes conclusiones: a) En los experimentos de falta de *abd-A* durante el periodo larvario no encontramos defectos en la epidermis sino la transformación descrita del A2 y posteriores a A1; b) la falta de *Ubx* en el A1 transforma a tórax en algunos clones, aunque otros parecen extruirse y no diferenciar; c) la falta de *Ubx* en el A1, o de *Ubx* y *abd-A* en A1 y posteriores, en el periodo larvario, no aumenta el número de histoblastos del nido, es decir, no se comportan los histoblastos como células de disco, que se dividen durante este periodo; d) la falta tanto de *Ubx* como de *abd-A* modifica ligeramente la morfología de los histoblastos. Una conclusión general, centrándonos en la comparación con los experimentos anteriores de ganancia de función de *abd-A*, es que el abdomen puede convertirse en tórax en algunas condiciones experimentales, pero que parece hacerlo manteniendo un comportamiento proliferativo durante el periodo larvario (falta de proliferación) característico de abdomen y no de disco imaginal.

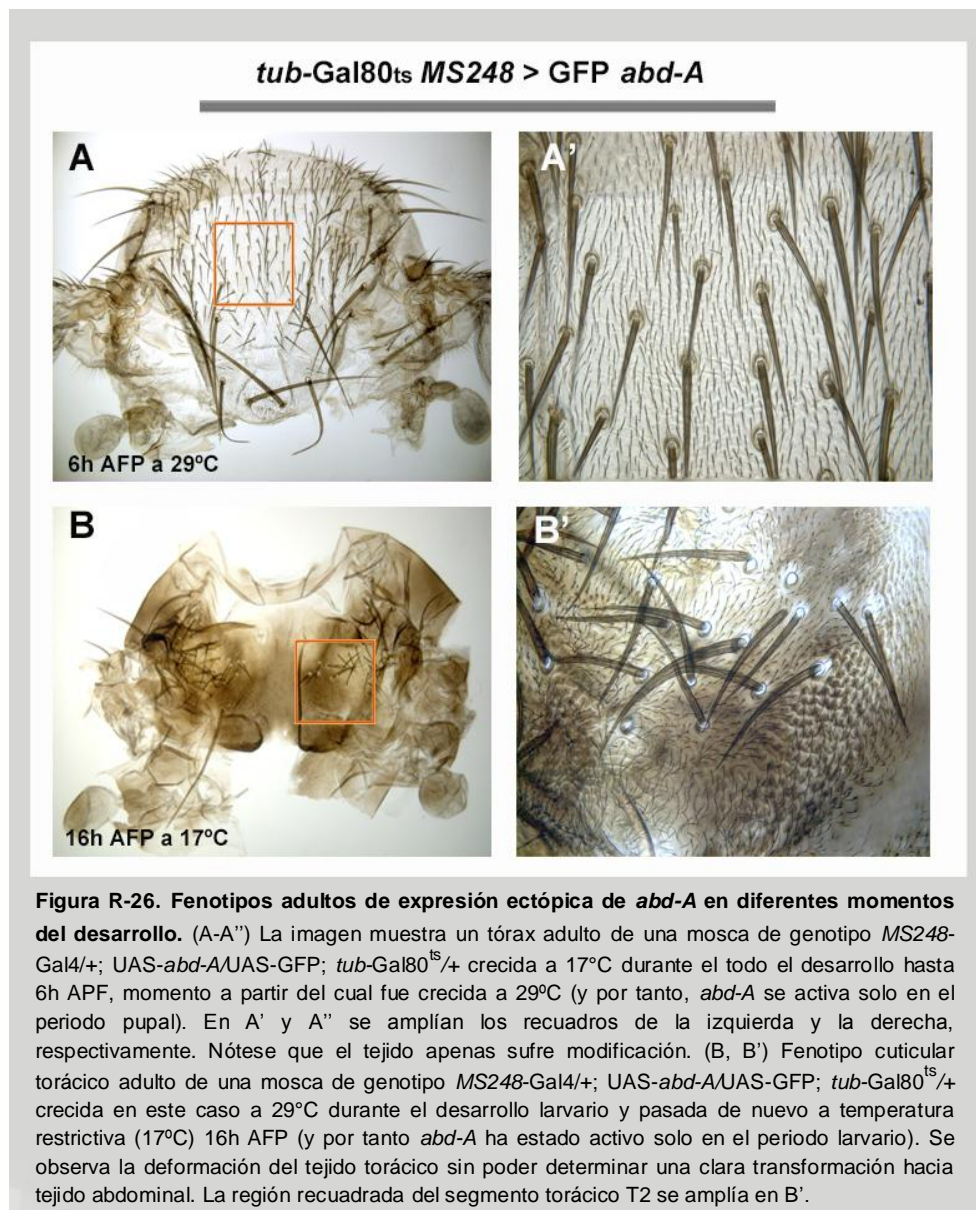
Es decir, tanto en experimentos de expresión ectópica como de silenciamiento de estos genes, no somos capaces de modificar el comportamiento proliferativo característico del tejido en el que inducimos cambios en la expresión, pero sí somos capaces de modificar la diferenciación de dichos tejidos.



3. Determinación de la función larvaria y pupal del gen *abd-A* en el desarrollo de la cutícula adulta.

Nuestros resultados precedentes apuntan a una función de *abd-A* en la diferenciación durante pupa, pero a una ausencia de función, en cuanto al comportamiento en división celular, en el periodo larvario. No queda claro, sin embargo, si la actividad de *abd-A* se requiere durante el periodo larvario para establecer la morfología del adulto. Para tratar de resolver esta cuestión, y haciendo uso de nuevo del sistema Gal4/Gal80^{ts}, nos propusimos activar o inactivar la función de este gen exclusivamente en el periodo larvario o pupal y observar los fenotipos resultantes. Diseñamos dos experimentos diferentes: a) expresión ectópica de *abd-A* en la región presuntiva de notum del disco imaginal de ala, y b) rescate de falta de función de *abd-A* en el abdomen. Para tratar de ajustar lo más posible la activación o inactivación génica a los periodos señalados, se tuvo en cuenta el posible retraso en la función debido al tiempo de activación/inactivación de la proteína Gal80^{ts} tras el cambio de temperatura (ver McGuire et al., 2003 y Material y Métodos).

- a) Expresión ectópica de *abd-A* en la región presuntiva de notum del disco imaginal de ala.



En la combinación *MS248-Gal4/+; UAS-abd-A / UAS-GFP; tub-Gal80^{ts}/+*, al activar la función de *abd-A* desde el comienzo del periodo pupal (cambiando las puestas 6h antes de la selección de pupas blancas a 29°C, es decir, 6h antes de la formación del pupario -6h AFP-, ver Material y Métodos) los individuos adultos (7 observados) muestran un tórax prácticamente normal salvo que presentan un mayor número de quetas (Fig. R-26 A-A''), pero no muestran fenotipo abdominal. Cuando la activación de *abd-A* se induce desde el comienzo del periodo larvario (pasando las puestas a 29° C tras 3 días de estar a 17°C) y se devuelven las larvas a 17°C para la inactivación del Gal4 16h AFP (es decir, que la expresión de *abd-A* solo está activa durante el periodo larvario), los adultos obtenidos muestran claros defectos en la formación del tórax, pero, significativamente, sin cambios evidentes de transformación hacia tejido abdominal (Fig. R-26 B-B').

Tras estos resultados, concluimos que, para la completa transformación del tejido torácico hacia tejido abdominal mediante la expresión ectópica de *abd-A*, se necesita la función de esta proteína tanto durante el desarrollo larvario como durante el desarrollo pupal. Estos datos no indicaban, sin embargo, si para la especificación correcta de un segmento abdominal por *abd-A* en el abdomen se necesitase la expresión de este gen en el periodo larvario, pupal o ambos. Para abordar este problema se realizó el segundo tipo de experimento, descrito a continuación

b) Rescate de la falta de función de *abd-A* en el abdomen.

Para este experimento se procedió a activar la expresión de *abd-A*, en el periodo larvario o pupal, en un fondo mutante para el mismo gen. En este caso hicimos uso de la mutación *iab-2^{R3}* que se obtuvo como un revertiente de una inserción de un elemento P-lacZ inserto en el gen *abd-A* (*abd-A^{lac1}*) (Casares, 1996). Esta mutación, en trans-heterozigosis con mutantes *abd-A*, produce una transformación del segmento A2 en el A1, visible por la morfología del terguito, que se asemeja al del A1, y la falta de cerdas en el esternito (el esternito del A2 tiene unas 10 cerdas en el individuo silvestre y en el A1 no hay cerdas en esa posición) (Casares, 1996). Por otra parte, la línea *abd-A-Gal4*, inserta en el cromosoma *MKRS* (Hudry y col., 2011), es mutante parcial para *abd-A* (y dirige la expresión en el dominio de este gen). En la combinación *iab-2^{R3}/MKRS, abd-A-Gal4* se observa una transformación del A2 en A1 (Fig. R-27 B, B', el fenotipo de una mosca de genotipo silvestre en A, A'), que se mantiene en la combinación *UAS-abd-A/tub-Gal80^{ts}; iab-2^{R3}/MKRS, abd-A-Gal4* a 17°C, cuando la proteína Gal80^{ts} está activa y la construcción *UAS-abd-A*, por tanto, inactiva (Fig. R-27 D, D'). Sin embargo, en un fondo mutante pero sin la construcción *tub-gal80^{ts}*, la proteína Abd-A rescata el fenotipo mutante (Fig. R-27 C, C'). Si mantenemos la combinación mutante a 17°C durante el periodo larvario y cambiamos a 29°C unas 6h antes del estadio de pupa blanca -6h AFP- (ver Métodos), de forma que *abd-A* se exprese en el periodo pupal solo, los individuos adultos (6 observados) muestran un rescate significativo del fenotipo mutante (Fig. R-27 E, E'). Por el contrario, no observamos rescate cuando activamos *abd-A* únicamente en el periodo larvario. Para este último caso, mantuvimos las puestas 3 días a 17°C, tras los cuales fueron pasadas a 29°C durante cuatro días, y devueltas a 17°C 16h AFP (Fig. R-27 G, G'). Para el caso de la inducción únicamente en el periodo pupal usamos un control sin *UAS-abd-A* (moscas hermanas de las que rescataban el fenotipo) para comprobar que el rescate se debía a la activación del UAS y no al cambio de temperatura (Fig. R-27 F, F'). Estos resultados sugieren que *abd-A* no se necesita en el periodo larvario, al menos para especificar el segmento A2, bastando para ello que esté activo en el periodo pupal.

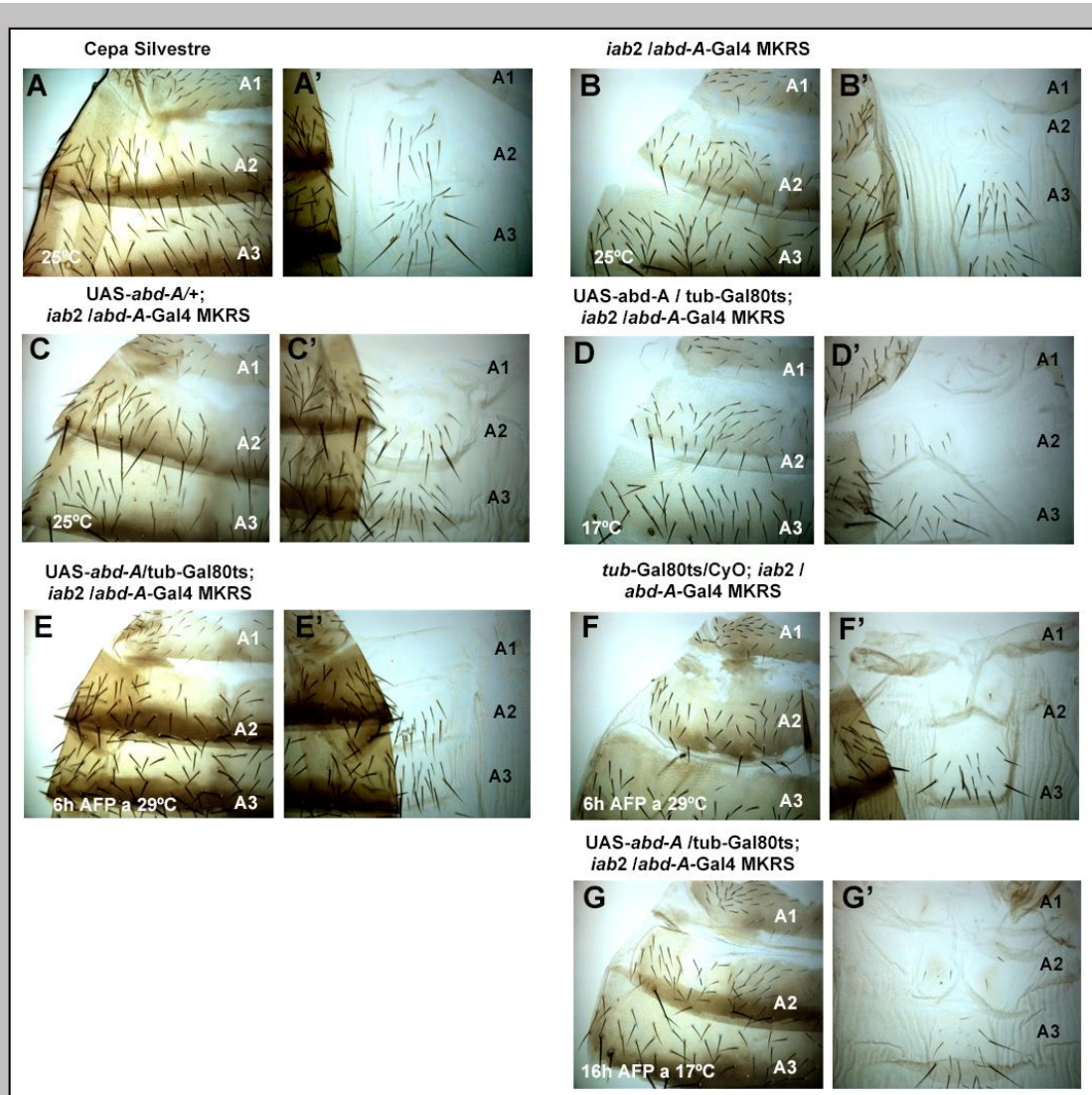
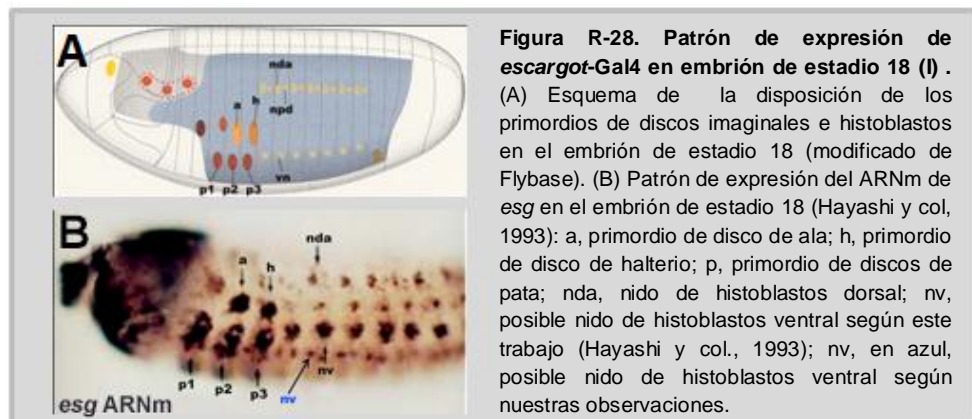


Figura R-27. Rescate de la falta de función de *abd-A* en el abdomen en periodos larvario o pupal. (A, A') Detalle de los tres primeros segmentos abdominales (A1-A3) de una mosca de genotipo silvestre. En A se muestra un detalle del abdomen dorsal (terguitos), en A' un detalle del abdomen ventral (esternitos). Nótese el número de quetas del esternito A2 y su ausencia en el A1 ventral. (B, B') Detalle de los segmentos abdominales A1-A3 de una mosca de genotipo *iab-2^{R3}/abd-A-Gal4 MKRS* donde se observa una transformación del A2 en A1, más notable en la región ventral (esternito de A2 sin apenas cerdas). (C, C') Detalle de los segmentos A1-A3 de una mosca *UAS-abd-A/+; iab-2^{R3}/MKRS, abd-A-Gal4* a 25°C. Se observa un claro rescate de la condición mutante (compárese con B, B'). (D, D') Detalle de los segmentos abdominales A1-A3 en una mosca *UAS-abd-A / tub-Gal80^{ts}; iab-2^{R3}/abd-A-Gal4 MKRS* a 17°C, cuando la proteína Gal80^{ts} está activa y la construcción *UAS-abd-A* inactiva. Nótese la falta de rescate. (E, E') Detalle de los segmentos A1-A3 de una mosca *UAS-abd-A/tub-Gal80^{ts}; iab-2^{R3}/abd-A-Gal4 MKRS* mantenida a 17°C durante el periodo larvario y cambiada a 29°C 6h AFP. Nótese el rescate significativo del fenotipo mutante (cómparese con B, B'). (F, F') Detalle de segmentos A1-A3 en una mosca *tub-Gal80^{ts}/CyO; iab-2^{R3}/abd-A-Gal4 MKRS* mantenida a 29°C durante el periodo larvario. Se transforma el A2 en A1. (G, G') Detalle de segmentos A1-A3 en una mosca *UAS-abd-A/ tub-Gal80^{ts}; iab-2^{R3}/abd-A-Gal4 MKRS*, pasada a 29°C durante cuatro días (periodo larvario) y devuelta a 17°C 16h AFP (pasando el periodo pupal sin expresión de *abd-A*). Nótese la falta de rescate (comparar con E, E').

4. Aproximación experimental para el estudio del papel de *abd-A* y *Ubx* en el desarrollo de los nidos de histoblastos durante el desarrollo embrionario.

En la Fig. R-24C describimos que la falta de función de *Ubx* en el periodo embrionario reducía en algunas ocasiones el número de histoblastos cuando el silenciamiento del gen era inducido desde el embrión. Este resultado concuerda con los resultados de Frayne y Sato, 1991 para mutantes bithoraxoid (*bxcd²⁶⁶*), donde también se describe la reducción del número de células que componen el nido de histoblastos en el A1 en condiciones mutantes mutantes para *Ubx*.

Ya que los genes Hox no podían cambiar el patrón de división celular de los histoblastos durante el periodo larvario, pensamos que era posible que este patrón se estableciera en el embrión, controlado por los genes Hox, y que se mantruviera después independientemente de éstos. Por ello decidimos ver los nidos de histoblastos en el embrión y describir los cambios observados en mutantes *Ubx*. Hayashi y col, 1993, muestran la expresión del ARNm de *esg*, y describen la posición de los nidos de histoblastos embrionarios (Fig. R-28 B). Nosotros decidimos usar la línea *esg-Gal4*, la misma que usábamos para el estudio en larva, para identificarlos. Lejos de lo que esperábamos, esta línea Gal4 tiene una expresión embrionaria más amplia que la esperada (Figs. R-29, R-30).



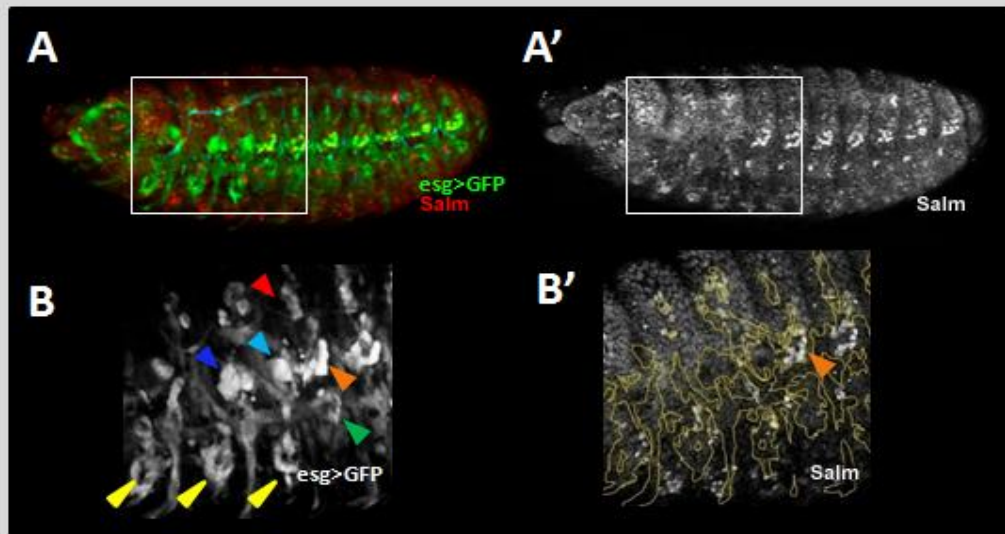


Figura R-29. Patrón de expresión de *escargot*-Gal4 en embrión de estadio 18 (II). (A) El patrón de expresión de *escargot*-Gal4 UAS-GFP (verde) presenta señal en más células que las descritas a partir del patrón de expresión de su ARNm. Presencia de la proteína Spalt mayor (Salm) (en rojo en A ; en blanco en A', B') en los grupos de células de los segmentos abdominales, con mayor intensidad de señal, indica que estos grupos se corresponderían con oenocitos y no con histoblastos (detalle indicado en B' con flecha naranja). (B) Ampliación de los segmentos torácicos T1, T2 y T3 y de los segmentos abdominales A1 y A2 del panel A. Las flechas indican los grupos de células que corresponderían a cada órgano con el siguiente código de color: amarillo, primordios de discos de pata; azul oscuro, primordio de disco de ala; azul claro, primordio de disco de halterio; rojo, posible nido de histoblastos dorsal anterior; naranja, nido ventral de histoblastos descrito según bibliografía (Hayashi y col., 1993) pero que creemos que corresponde a oenocitos (ver B'); verde, posible nido ventral de histoblastos descrito según nuestras observaciones.

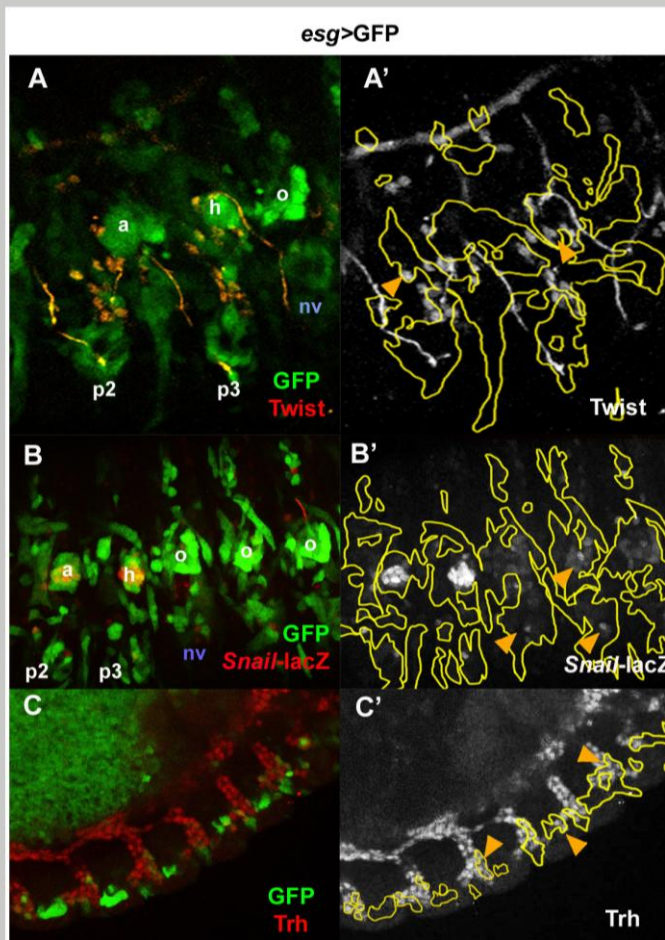


Figura R-30. Patrón de expresión de *escargot*-Gal4 en embrión de estadio 18 (III): Determinación de grupos celulares marcados por la línea *escargot*-Gal4. (A-C') Detalle de visiones laterales de embriones de estadio 18 de genotipo *esg*-Gal4 UAS-GFP en los que la expresión dirigida por la línea *esg*-Gal4 se marca con GFP (en verde en A, B y C y delimitado por líneas amarillas en A', B' y C'). Los paneles muestran el detalle de los segmentos con diferentes tinciones. (A, A') Embriones teñidos con anticuerpos contra Twist (en rojo en A, y en gris en A'), que marca precursores musculares. (B, B') Embriones teñidos contra β -galactosidasa, que marca la expresión de la línea *snail*-lacZ, cuya señal se detecta en los precursores de disco de ala y halterio, algunas células de discos de pata y lo que podrían ser histoblastos y oenocitos. (C, C') Embriones teñidos contra Trachealess (en rojo en C, en gris en C'), que indica precursores de tráqueas. En los tres casos se observa co-expresión de los anticuerpos con la señal GFP en algunas células. p2 y p3, hacen referencia a los primordios de patas 2 y 3 respectivamente; a, primordio disco de ala; h, primordio disco de halterio; o, oenocitos; nv azul, posible nido ventral de histoblastos. Las flechas naranjas señalan zonas de co-expresión de la línea Gal4 con cada uno de los anticuerpos utilizados.

Para concretar el tipo de tejido u órgano en el que encontramos expresión de GFP (embriones *esg-Gal4 UAS-GFP*), recurrimos a la literatura en busca de marcadores específicos que se expresaran en las células marcadas. Uno de ellos es *spalt major (salm)*. Tal y como está publicado, *salm* codifica un factor de transcripción con dominios de dedos de Zinc, cuya expresión en el abdomen se restringe a los oenocitos, o células de tipo hepático, y regula el desarrollo de las mismas (Rusten y col., 2001; De Celis y Barrio, 2009). Mediante el uso de un anticuerpo específico contra la proteína Salm pudimos comprobar co-expresión de *esg* y Salm en la zona lateral de los segmentos abdominales, por lo que pensamos que la identificación de estas células como nidos ventrales (Hayashi y col., 1993) es quizás errónea, ya que parece corresponder más bien a oenocitos (Fig. R-29). Por otra parte, nos servimos del anticuerpo para Twist, como marcador de precursores de tejido muscular adulto (Bate y col., 1991) que podrían también encontrarse formando parte de los nidos en el embrión (Currie y Bate, 1991). Encontramos, efectivamente, expresión coincidente de *esg* y Twist, por lo que además de las células imaginales, esta línea Gal4 tiene expresión en precursores de músculo (Fig. R-30 A, A') pero no pudimos identificar inequívocamente los histoblastos. Otro marcador que utilizamos fue *snail*, cuya expresión más fuerte se encuentra en los precursores de los discos de ala, halterio y disco genital, mostrando señal en sólo algunas células de los discos de pata (Alberga y col., 1991). En nuestros embriones que expresan la línea *esg-Gal4* encontramos, aparte de la señal coincidente con Snail en los discos imaginales, células a lo largo del abdomen que también expresaban ambos genes, aunque tampoco aquí estamos seguros de que correspondan a nidos de histoblastos (Fig. R-30 B, B'). Cuando recurrimos al uso del anticuerpo contra Trachealess, que se expresa en precursores de tráqueas, encontramos que, tal y como está descrito (Sato, 2002), hay señal coincidente con células que expresan *esg* (Fig. R-30 C, C'). En definitiva, la diversidad de tipos celulares marcados con la línea *esg-Gal4* nos hizo imposible identificar de forma inequívoca qué células en el embrión se corresponden con los histoblastos, por lo que no pudimos llevar a cabo nuestro abordaje en el que estudiar el efecto del silenciamiento de *Ubx* y *abd-A* en su desarrollo en el embrión.

5. Análisis de la expresión y actividad de *string* como inductor de la re-entrada en mitosis de los nidos de histoblastos

Como se describía en la Introducción, la activación de *stg* (Russell y Nurse, 1986; Edgar y O' Farrell, 1989; Edgar y col., 1994) al comienzo de la pupación (Ninov y col., 2009) es indispensable para la reanudación del ciclo celular de los histoblastos (Fig. I-7). La expresión ectópica de *stg* en el periodo larvario (larvas *esg-Gal4 UAS-stg*, su expresión temporal modulada por la construcción *tub-Gal80^{ts}*) aumentaba significativamente el número de histoblastos (Ninov y col., 2009) mientras que se reducía el tamaño de los mismos (Fig. R-31 B-C', comparar con el control en A-A"; ver también la Fig. R-12). Esto último se corresponde con lo que ocurre tras la reanudación del ciclo celular al comienzo de la pupación, debido a que las primeras divisiones de los nidos, tal y como está descrito en Ninov y col., 2007 y 2009, tienen lugar sin crecimiento celular, por lo que el tamaño de las células se ve reducido. Las células (y sus núcleos) que componen los nidos también presentaban cambios en su morfología característica del periodo larvario -observada gracias al marcaje con anti-FasIII y To-Pro-: pierden el festoneado característico de la larva silvestre y modifican las características picnóticas de sus núcleos (Fig. R-31 A-C'), asemejándose a la morfología celular encontrada en pupa tras la entrada en el periodo de proliferación (ver Fig. R-12 A-B'''). Es decir, la expresión de *stg* es suficiente no solo para reanudar el ciclo celular sino para conferir a los histoblastos unas características morfológicas propias del comienzo de la pupación.

Por otra parte, en Ninov y col., 2009 describen una línea *string-lacZ (Stringb-E5.3III)* (Lehman y col., 1999) con expresión exclusiva de histoblastos. Decidimos usar esta línea para determinar si la expresión ectópica de *abd-A* era suficiente para activarla. En discos de ala de larvas *stg-lacZ* observamos señal en el "pouch" y, sobre todo, en la zona del "hinge" pero solo una

expresión muy residual en el notum presuntivo (Fig. R-32 A). La expresión no cambia en las primeras 3h de pupación (Fig. R-32 C). En los histoblastos de larva no detectamos señal (Fig. R-32 B, B') pero sí se observa en estas células a partir del periodo de pupación (Fig. R-32 D, D') (Ninov y col., 2009). La expresión ectópica de *abd-A* en la región de notum del disco de ala no induce la expresión de la construcción *esg-lacZ* ni durante el tercer periodo larvario (Fig. R-33 B, B', compárese con el control en A, A') ni durante las primeras horas de la pupación (Fig. R-33 D, D', compárese con el control en C, C'). Como en experimentos anteriores, la expresión forzada de *abd-A* en el disco de ala no estimula la expresión génica) propia de abdomen (en este caso, de la línea *stg-lacZ*, al menos en larva III y las primeras horas de pupación.

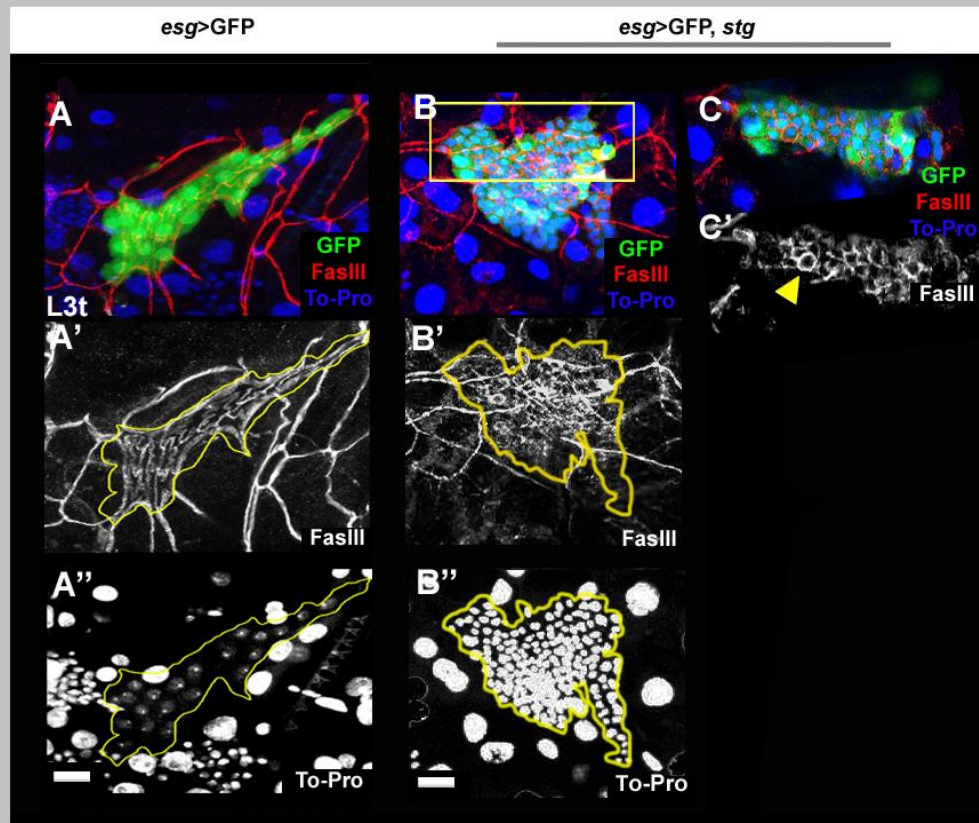
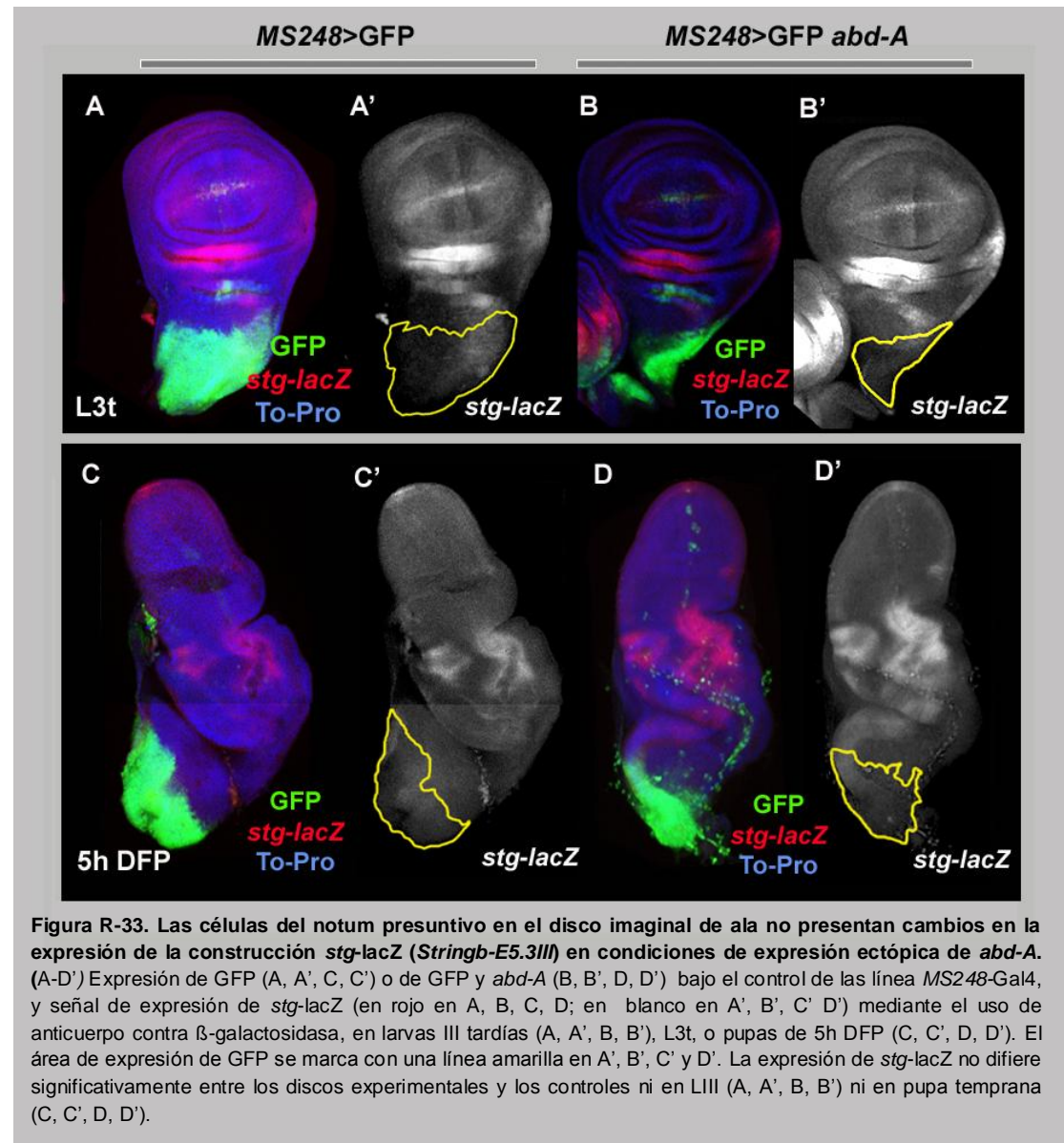
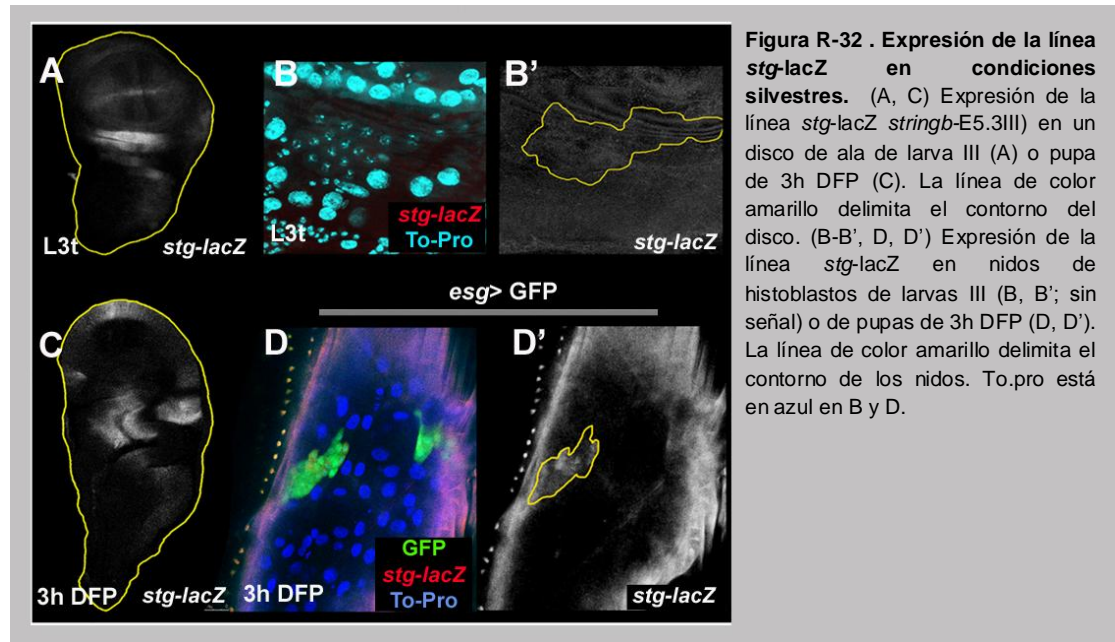


Figura R- 31. La expresión ectópica de *string* causa proliferación prematura de las células de los nidos de histoblastos en larva. (A-A'') Larva de genotipo *esg-Gal4 UAS-GFP*. (B, B'') En larvas con expresión ectópica de *stg* (*esg-Gal4 UAS-GFP/UAS-stg; tub-Gal80^{ts}/+*, pasadas a 29°C en larva I, el número de células que componen los nidos aumenta notablemente respecto al de individuos silvestres y se modifica asimismo la naturaleza picnótica de sus núcleos (compárese A, A'' con B, B''). (C, C') Detalle de un solo plano de la zona recuadrada en B. Las células de los nidos también ven modificada su morfología característica del periodo larvario, perdiendo el festoneado de la condición silvestres (B, B', C, C', compárese con el silvestre en A, A'). GFP marca en verde la expresión de *esg-Gal4* en A, B y C; FasIII (en rojo en A, B, C, en blanco en A', B' y C') marca el contorno celular y To-Pro, marca ADN en azul en A, A'', B, B'' y C. La línea de color amarillo delimita el área correspondiente a la zona de expresión de GFP (nido de histoblastos). L3t, larva III tardía. La línea de color blanco en la parte inferior izquierda en A'' y B'', corresponde a 15 µm.



6. Determinación de la función de los genes *Ubx* y *abd-A* en las células epidérmicas larvarias (CELs).

Aunque nuestros experimentos de análisis clonal y expresión de líneas ARNi con *esg-Gal4* demuestran una función de *Ubx* y *abd-A* en los histoblastos, es posible que su función en el desarrollo del abdomen viniera también mediada por su expresión en las células epidérmicas larvarias (CELs) que rodean a los nidos. A este respecto, es importante tener en cuenta que la formación de la epidermis abdominal está dirigida por migraciones celulares (Ninov y col., 2007; Bischoff y Cseresnyés, 2009; Bischoff y col., 2013) en las que juegan un papel fundamental la muerte de las CELs al comienzo de la expansión de los nidos en el desarrollo pupal. Además, el hecho de que las células imaginales que componen los nidos estén embebidas en la epidermis, a diferencia de las células que componen los discos imaginales, podría seguramente estar condicionando el comportamiento proliferativo de los propios nidos.

De acuerdo con esto, en un trabajo anteriormente publicado por Singh y Misrha, 2014, describen una función de *abd-A* en la delaminación de las CELs que condicionaría la expansión de los nidos de histoblastos. Según los autores, *abd-A* sería esencial en el proceso de muerte de estas CELs, de manera que el silenciamiento de este gen mediante el uso de ARNi lleva consigo la supervivencia de las mismas, lo que impediría la correcta expansión de los histoblastos, y por tanto la correcta formación de los segmentos abdominales, obteniéndose como resultados individuos que mueren en farato sin llegar a diferenciar tejido cuticular abdominal.

Nosotros quisimos repetir estos experimentos e incluir también el análisis de la función de *Ubx* en estas células. Para ello utilizamos construcciones de ARN interferente para estos dos genes y la misma línea que usaron estos autores, *Eip71CD-GAL4*, específica de las CELs. Al inactivar la función de *Ubx* o *abd-A* a partir del periodo larvario (es decir, pasando las puestas a 29°C tras 3 días a 17°C en larvas de genotipos *Eip71CD-GAL4 UAS-GFP/UAS-abd-A ARNi*; *tub-Gal80^{ts}* (Fig. R-34 A-B') o *Eip71CD-GAL4 UAS-GFP; UAS-Ubx ARNi / tub-Gal80^{ts}* (Fig. R-34 C-C')) comprobamos que a diferencia de lo publicado en estudios anteriores (Singh y Mishra, 2014) no conseguimos ver problemas de formación cuticular más allá de defectos en el cierre dorsal de alguno de los segmentos y/o problemas de fusión de segmentos. En el caso del silenciamiento de *Ubx*, los problemas de fusión entre segmentos ocurren únicamente entre los segmentos A1 y A2 (Fig. R-34 C, C'). No obstante, el silenciamiento de ambos genes simultáneamente impidió completamente el desarrollo de los individuos, que morían al comienzo de la pupación sin llegar ni siquiera a desarrollar las estructuras cuticulares adultas de las regiones torácicas y cefálicas. Este resultado sugiere la existencia de una función en las CELs de los genes *Ubx* y *abd-A* redundante y esencial en el desarrollo de los individuos.

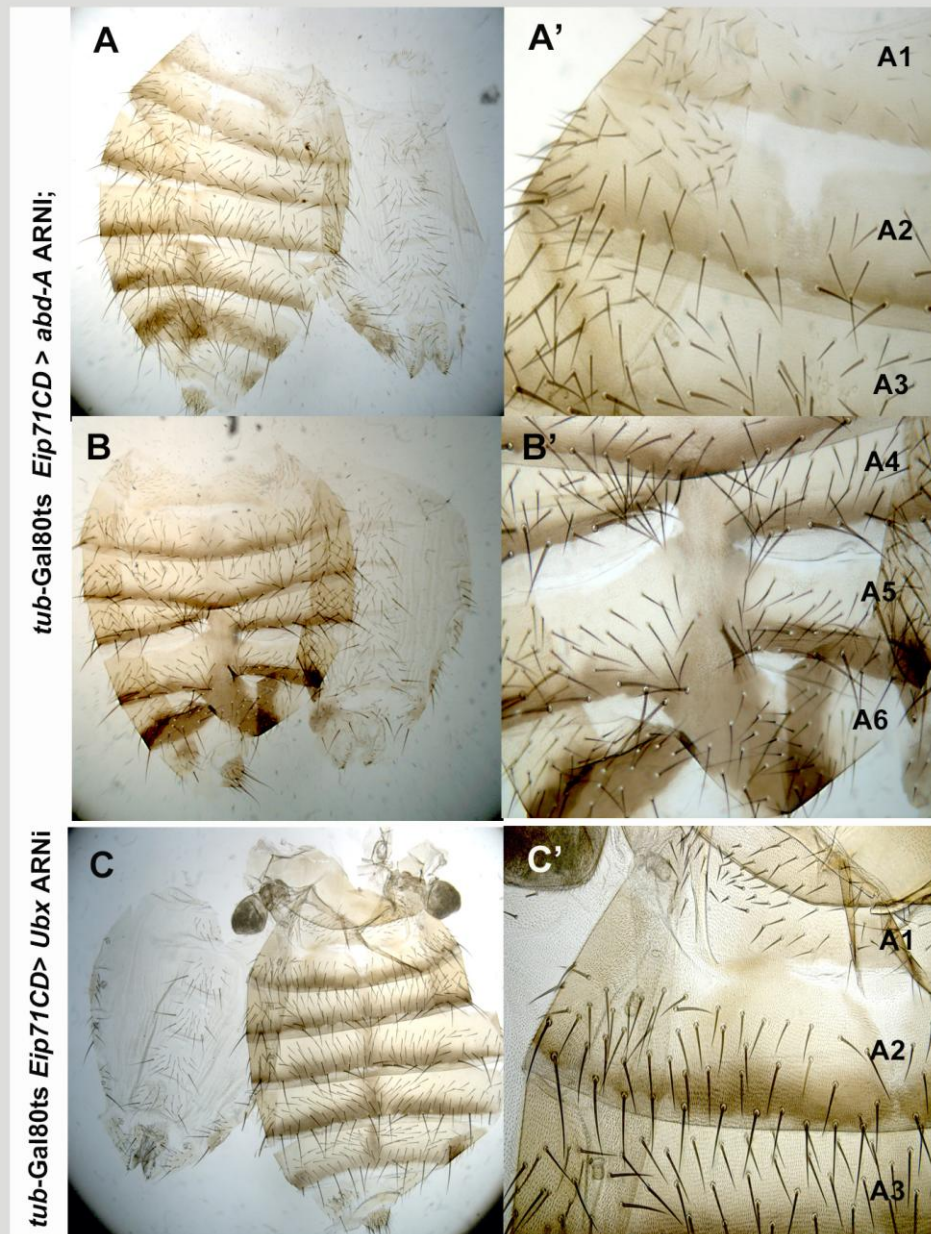


Figura R-34 . Fenotipos abdominales en condiciones de falta de función de *abd-A* o *Ubx* en las CELs. (A-B') Los adultos que expresan el ARNi para *abd-A* desde los primeros estadios larvarios a 29°C usando la combinación *Eip71CD-Gal4*; *tub-Gal80^{ts}*, muestran defectos de fusión en la zona central dorsal de los primeros segmentos abdominales (A, A', detalle en A'), y en los casos más severos fuertes problemas de cierre dorsal junto a un fenotipo de fusión de segmentos (B, B'). (C, C') Los adultos que expresan el ARNi para *Ubx* desde los primeros estadios larvarios a 29°C, de genotipo *Eip71CD-Gal4*; *tub-Gal80ts/ UAS-Ubx* ARNi presentan problemas de fusión entre los segmentos A1 y A2 (detalle en C'). Ninguno de los individuos presenta defectos más extremos.

DISCUSIÓN

Aunque los componentes genéticos que controlan el desarrollo están muy conservados en todas las especies animales, variaciones en la regulación y el funcionamiento de estos genes son suficientes como para generar un alto grado de diversidad en los procesos de desarrollo controlados por los mismos. Un grupo importante de genes que regulan el desarrollo es el de los genes Hox, que especifican órganos y estructuras en el eje A-P de los animales bilaterales (Pearson y col., 2005). Estos genes se encuentran muy conservados en especies muy alejadas (García-Fernández, 2005), por lo que el estudio de cómo regulan diferentes procesos nos permite no solo extrapolar los hallazgos encontrados en un organismo modelo, como *Drosophila melanogaster*, a otras especies, sino que podría llevarnos a explicar cómo surgen también determinadas estrategias de respuesta al entorno en cada especie, siendo tal análisis de vital importancia en Biología aplicada y en el área de Evo-Devo.

El estudio de los genes Hox ha llevado a definir una serie de funciones celulares de las que son responsables, y a caracterizar genes realizadores que median estas funciones (Rezsohazy y col., 2015). Sin embargo, solo se han identificado unos pocos genes regulados por los genes Hox que ilustren como se llevan a cabo las variaciones en el patrón segmental básico de un organismo. Debido a la diversidad de formas de interacción que los genes Hox pueden presentar y a la diversidad de tipos celulares y estadios del desarrollo en el que ejercen su función, es difícil obtener una visión general de su función. Muchos estudios se concentran, pues, en estudiar procesos celulares determinados en organismos modelo, como *Drosophila*, y tratar de definir así reglas generales por la que estos genes controlan tales procesos.

En la presente Tesis hemos desarrollado experimentos para analizar algunos aspectos de la función de los genes Hox *Ubx* y *abd-A* en el desarrollo del abdomen de *Drosophila*. Nuestro estudio nos ha llevado a definir la función de los mismos en relación con la regulación de la proliferación por los genes Hox, la interacción entre forma de crecimiento y formación de patrón, y los requerimientos temporales en especificar las estructuras de abdomen. En la Discusión trataremos en detalle estos puntos.

1. Los genes Hox y la regulación de la proliferación

Los genes Hox determinan las características celulares de distintas estructuras.. Esto implica que regulan, supuestamente, todas las características celulares de un determinado órgano, diferenciándolas, si es el caso, de la de otras estructuras homólogas en el eje A-P. De hecho, son cada vez más numerosas las evidencias que sitúan a los genes Hox como reguladores directos de procesos celulares tales como la división, adhesión, movilidad o muerte celulares (Choo y Russell, 2011; Sánchez-Herrero, 2013; Rezsohazy y col., 2015; Rux y Wellik, 2017). Estudios realizados con “microarrays”, en los que se ha regulado el tiempo de activación/represión génica por genes Hox (Zhao y Potter, 2001; Hueber y col., 2007; Pavlopoulos y Akam, 2011), así como experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) (McCabe e Innis, 2005; Salsi y col., 2008; Donaldson y col., 2012; Rezsohazy y col., 2015) han identificado genes relacionados con esta funciones y que son regulados, en general, de forma directa por los genes Hox. La expresión de genes Hox es pues, necesaria y suficiente para cambiar las características celulares de diferentes segmentos o estructuras.

Una de las funciones controladas por los genes Hox es la proliferación celular y el control del tamaño. Numerosos ejemplos existen de esta regulación en *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* y vertebrados (Salser y Kenyon, 1996; Prokop y col., 1998; Krosi y Sauvageau, 2000; Shemer y Podbilewicz, 2002; Hoegg y Meyer, 2005; Monedero y col., 2017). El ejemplo más clásico es el de alas y halterios en *Drosophila melanogaster*. Las alas, presentes en el segundo segmento torácico, son mucho más grandes que los halterios, órganos homólogos en el tercer segmento torácico. Esta diferencia de tamaño se debe al gen Hox *Ubx*, ya que su falta de función transforma halterios en alas y su ganancia de función realiza la transformación

recíproca (Lewis, 1963; Lewis, 1978). Esta diferencia se debe en parte a la regulación por *Ubx* en los discos de halterio de la vía de Dpp, una vía de señalización que regula el crecimiento (Restrepo y col., 2014). *Ubx* reduce la expresión y actividad de Dpp en el halterio, afectando a la proliferación y al tamaño del disco durante el periodo larvario (Crickmore y Mann, 2006; De Navas y col., 2006; Makhijani y col., 2007; Crickmore y Mann, 2007). *Ubx* regula asimismo otras vías de señalización, como la vía de Wingless, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) o la vía de Hippo, que asimismo contribuyen a regular el tamaño (Weatherbee y col., 1998; Prasad y col., 2003; Pallavi y col., 2006; Singh y col., 2015). Finalmente, *Ubx* controla también el tamaño celular (las células del ala son mucho mayores que las del halterio) (Roch y Akam, 2000) y por consiguiente el distinto tamaño de los dos órganos. *Ubx* regula el tamaño, por consiguiente, gobernando distintas vías de señalización y afectando a procesos celulares como el control de la división o el tamaño celular.

Como ya se ha mencionado previamente, el abdomen del adulto de *Drosophila* proviene de grupos de células -nidos de histoblastos- que no se dividen durante el periodo larvario, mientras que el tórax deriva de otros grupos de células -discos imaginales- que sí lo hacen. De los tres genes Hox que se expresan en el abdomen es *abd-A* aquel cuya expresión ectópica genera tejido abdominal claramente identificable, tal y como se demostró en experimentos previos (Lewis, 1978, Shimell y col., 1994; Casares y col., 1996). Nosotros hemos observado igualmente dichas transformaciones, por lo que suponíamos que la expresión ectópica de este gen en la región presuntiva del tórax en el disco imaginal de ala debería ser suficiente para convertir las células de ese disco en células abdominales (histoblastos) con todas sus características, incluyendo la parada en proliferación en el periodo larvario.

Sin embargo, hemos encontrado que la expresión ectópica de *abd-A* en la zona presuntiva de notum del disco de ala hace que las células de este primordio se sigan dividiendo, durante el periodo larvario, como las células circundantes del disco, y no como los histoblastos (que no deberían dividirse en este periodo). Es decir, *abd-A* no es suficiente para conferir a las células del disco las características de proliferación de los histoblastos durante el periodo larvario (ausencia de proliferación). Esto lo hemos comprobado observando la expresión de distintos marcadores del ciclo celular (pH3, BrDU, Cyc-E, herramienta FlyFucci) así como viendo el crecimiento de los clones mutantes respecto al crecimiento de clones controles. La función de *Abd-A* en estos experimentos se demuestra por las transformaciones homeóticas. No creemos que la ausencia de parada del ciclo celular se deba a una 'perdurancia' de la función que hace continuar el ciclo celular propio del disco imaginal, ya que observamos los resultados hasta 48-72h después de la inducción del gen Hox en el caso de los clones o con líneas Gal4 que comienzan a expresarse tempranamente en la larva.

Más aún, nuestros experimentos indican que en las primeras 5h de la pupación tampoco se modifica el ritmo de división celular por la expresión de *abd-A*: los histoblastos sufren 3 divisiones muy rápidas en las primeras horas de pupación, en las que se reduce el tamaño celular ya que no hay crecimiento (Madhavan y Madhavan, 1980; Ninov y col., 2007; Ninov y col., 2009; Singh y Mishra, 2014); sin embargo, en los discos de ala que expresan *abd-A* el tamaño celular a las 5h DFP no es más pequeño que a las 0h, sugiriendo, de nuevo que el ritmo de división en este periodo no es el propio de los histoblastos.

La proliferación de los histoblastos al comienzo de la pupación depende de *string*, cuya expresión está reprimida durante el periodo larvario en estas células (Ninov y col. 2009). *abd-A* no es suficiente para inducir la expresión de una línea indicadora *stg-lacZ*, señalada como específica de histoblastos (Ninov y col., 2007), en células del notum presuntivo, lo que refuerza la idea de que el gen Hox no es capaz de dirigir un régimen proliferativo propio de estas células.

Hemos demostrado, por tanto, que *abd-A* no es suficiente para modificar el ritmo de división celular cuando se expresa en el disco imaginal de ala. Más difícil es concluir si los genes Hox son necesarios para determinar el ritmo de proliferación celular propio de los histoblastos. En el caso de *Ubx*, hemos inactivado el gen en el segmento A1 con un ARNi y no hemos observado, durante el periodo larvario, que los histoblastos proliferasen, es decir, no adoptan un patrón de proliferación propio de disco imaginal. La inactivación simultánea de *Ubx* y *abd-A* con expresión de construcciones de ARNi tampoco induce proliferación en los nidos de histoblastos. Una crítica a estos resultados, sin embargo, es que no hemos obtenido una transformación clara de abdomen a tórax en estas combinaciones mutantes: observamos una reducción muy importante del segmento A1 y la aparición de un tejido que no es abdominal, pero sin mostrar tampoco unas características inequívocas de notum. Una transformación completa se consigue induciendo clones de alelos nulos, pero para ello se necesita una división celular, que no tiene lugar en histoblastos larvarios. De cualquier forma, nuestros resultados de ganancia de función indican que hay dos formas de hacer un segmento abdominal, en lo que respecta a la forma de crecimiento: sin divisiones celulares durante el periodo larvario (el individuo silvestre) o con divisiones celulares durante el mismo (tras expresión ectópica de estos genes Hox en el disco imaginal de ala).

Es posible que los genes abdominales (*Ubx* a niveles altos, *abd-A*) “fijen” el modo de división en el abdomen (no división de histoblastos), una vez que estos se hayan determinado, en el embrión tardío, y que este modo no pueda revertirse durante el periodo larvario por la ausencia de estos genes ni establecerse tras expresión ectópica en los discos imaginales. Quizás un experimento que se podría hacer es inducir clones mutantes para *Ubx* en el periodo embrionario tardío y observar si crecen en los histoblastos del A1 en larva, o inducir la expresión ectópica de *abd-A* en el disco de ala en este mismo periodo y ver si la división se detiene al llegar a larva.

2. Coordinación de crecimiento y formación de patrón

Durante el desarrollo de un determinado órgano o tejido de un organismo multicelular, la formación de patrón y el crecimiento son procesos controlados de una forma coordinada (Serrano y O'Farrell, 1997; Lecuit y LeGoff, 2007; Restrepo y col., 2014; Irvine y Harvey, 2015). La conjunción se lleva a cabo por la actividad de un discreto número de señales moleculares, y sus correspondientes vías, que darán lugar a una estructura bien formada, con su particular forma, tamaño y patrón. Es decir, que el correcto desarrollo de un tejido u órgano depende de la coordinación entre los dos principales procesos de la morfogénesis como son formación de patrón y crecimiento, donde el crecimiento se define frecuentemente como consecuencia de la proliferación celular.

En *Drosophila*, podemos encontrar varios trabajos acerca de la coordinación de estos procesos en discos imaginales. Por ejemplo, en el disco de ala, durante los periodos embrionario y larvario, van apareciendo la formación de compartimentos A/P y D/V, y la expresión de genes que determinan patrón y crecimiento en estos ejes. Mediante la activación de vías como las de Dpp, Wg o EGFR se desarrollan elementos de notum, “hinge” y “pouch”, de forma sucesiva en el disco de larva II y III (Díaz-Benjumea y Cohen, 1993; Basler y Struhl, 1994; Williams y col., 1994; Zecca y Struhl, 2010). Es decir, el crecimiento del disco imaginal de ala está regulado por múltiples señales en diferentes escalas (Edgar, 2006; Martín-Castellanos y Edgar, 2002; Nijhout y Grunet, 2010; Schwank y Basler, 2010) incluyendo mecanismos de interacción celular, regulación de la proliferación, señalización en compartimentos y regulación humoral (hormonal), al igual que ocurre en otros tejidos en vertebrados (Reversade y De Robertis, 2005; Lander, 2011). Estas señales se acompañan además con las que especifican el patrón morfológico.

Un ejemplo claro del acoplamiento de la formación de patrón y crecimiento en *Drosophila*, se describe en Martín y col., 2009, donde al inducir un retraso en el desarrollo del compartimento anterior del disco imaginal de ala, mediante la inducción clonal de células homocigotas *Minute+* (que confieren ventaja proliferativa) sólo en el compartimento posterior, el compartimento que va más lento (el anterior en este caso), presenta un patrón de *wg* característico de etapas previas del desarrollo, es decir, más anterior en el tiempo, indicando que la diferencia de ritmo de crecimiento en los distintos compartimentos va acompañada de diferencias en la formación de patrón.

En relación a este trabajo, los experimentos de Weigman y col., 1997 indican que aunque se pare el ciclo celular se sigue formando el patrón de forma correcta. En este trabajo describen como el crecimiento celular continúa tras la inactivación de la proteína Cdc2 (al cambiar la temperatura usando un alelo termo-sensible), de forma que no hay división celular; a pesar de ello, la parada de la división celular no parece afectar a la formación de patrón (observado estudiando la actividad de las vías de Dpp y Hh). Los mecanismos que regulan el tamaño del disco aquí no funcionan por regulación de la división celular, pero parecen actuar directamente sobre el tamaño celular en términos de volumen del tejido, ya que el tamaño celular aumenta al disminuir el número de células. Observan, por tanto, que el crecimiento y, en general, la formación del patrón pueden desarrollarse con normalidad en ausencia de división celular. Es decir, como se describe también en Neufeld y col., 1998, variar el ciclo celular no implica cambiar el tamaño (ya que puede compensarse por el tamaño celular), y el ritmo de proliferación y la formación de patrón pueden desacoplarse hasta cierto punto (Weigman y col., 1997).

Con respecto a los trabajos que acabamos de describir (Weigman y col., 1997; Neufeld, y col., 1998) encontramos un trabajo más reciente en el que se ha observado que en condiciones en las que la parada del ciclo celular se extiende por un periodo mayor, el tamaño del compartimento en el que se inhibe la división celular se reduce con respecto al tamaño normal (Montes y Morata, 2017). En este caso también se produce, inicialmente, el aumento del tamaño celular, pero tras una parada del ciclo más prolongada el tamaño celular no aumenta y el disco “trata de compensar” la ausencia de división en un compartimento aumentando la proliferación en el adyacente, de forma que el tamaño final de todo el disco pueda acercarse a la condición silvestre (Montes y Morata, 2017). No se estudió la formación de patrón en este trabajo, por lo que no podemos concluir sobre si existen mecanismos para acoplar la falta de proliferación (y el aumento en el otro compartimento) con la formación de un patrón normal. Del conjunto de experimentos, sin embargo, parece concluirse que existen mecanismos para que la formación de un determinado patrón y el crecimiento (aunque no siempre la división celular) se coordinen.

Nosotros hemos encontrado una variación con respecto a la situación silvestre, en el ritmo de proliferación y la formación final de una determinada estructura. Al estudiar los efectos de la inducción de la expresión del gen Hox *abd-A* (requerido fundamentalmente para especificar abdomen) en la zona presuntiva de notum del disco imaginal de ala, hemos observado que el tejido crece como disco (la división celular continúa y el tamaño celular no cambia), pero forma un patrón de abdomen (en el adulto). Desarrollar un segmento abdominal en el individuo adulto no requiere, pues, la parada de división celular de sus células precursoras durante la larva.

Por otra parte, aunque observamos tejido abdominal en el disco de ala por la expresión ectópica de *abd-A* tanto en los casos de sobre-expresión en dominios concretos como tras la inducción de clones, la recuperación de éstos en el adulto ha sido escasa. Varios de estos clones, además, presentaban un gran tamaño. Es posible que sólo aquellos clones que eran lo suficientemente grandes como para protegerse de la extrusión, debida a las diferencias de afinidad con el tejido circundante, fueran capaces de permanecer en el tejido y diferenciarse. Posiblemente estos clones grandes puedan ser el resultado de la fusión de varios clones

pequeños que salvaran de esta forma la extrusión. Un proceso parecido se ha sugerido para explicar la presencia de clones *lethal giant larvae* (que cuando están aislados mueren por competición celular) en el disco imaginal de ala (Menéndez y col., 2010).

Si bien el crecimiento observado en los individuos mutantes sigue el patrón de disco durante el periodo larvario (y posiblemente también en pupa) es más difícil concluir que el patrón de expresión génica corresponda al de abdomen o al de disco. Los experimentos con *eyg* (clones de expresión ectópica de *abd-A*) sugieren que el patrón de disco no se mantiene, aunque en los casos de expresión ectópica de *abd-A* en el dominio de expresión de la línea *MS248-Gal4 eyg* y otros genes (*neu*, *wg*), mantienen algo de expresión. Sin embargo, quizás el mejor ejemplo de que la expresión de *abd-A* no es suficiente para dar un patrón propio del abdomen durante el periodo larvario la proporcione la inserción *A101-lacZ* en el gen *neu*. Mientras que detectamos expresión de esta construcción en los histoblastos larvarios, no encontramos expresión generalizada en todas las células del disco que expresan el gen Hox. No obstante, la falta de marcadores típicos de histoblastos en larva (excepto *A101-lacZ*) hace difícil afirmar que *abd-A* transforma el patrón de disco a histoblasto en este estadio, aunque parece que sí están impidiendo la formación correcta del patrón torácico. Este punto requiere nuevos experimentos y la búsqueda de marcadores específicos de histoblastos durante este periodo. En cualquier caso, la expresión de *omb*, *eyg*, *neu* y *wg* a las 24h de pupación indica claramente que *abd-A* induce la formación de un patrón típico de abdomen en el tórax en estas etapas de pupa. Sería interesante comparar si la secuencia génica temporal de formación de este patrón es la misma al expresar ectópicamente *abd-A* en el disco, que en el abdomen en situación silvestres, ya que en el primer caso se parte de un número de células mayor al comenzar la pupación.

Por otro lado, a pesar de que a nivel proliferativo no se han descrito diferencias claras entre el comportamiento de la región de disco de ala que dará lugar al apéndice y la que formará la región del eje central del cuerpo durante el periodo larvario tardío (Milán y col., 1996), sí hemos podido observar diferencias en cuanto al comportamiento proliferativo de ambas regiones en pupación. Hasta ahora, la mayor parte de estudios han estado centrados en el análisis de la división celular de la región que originará el apéndice, habiendo poca información acerca de la que compondrá la pared corporal del adulto. Se ha descrito que la región del apéndice sufre dos divisiones celulares durante la pupación, entre las 12-24h DFP, y que para su división a las 24 horas (Schübiger and Palka, 1987; Milán y col., 1996; O'Keefe y col., 2012; Guo y col., 2016); por contra, hemos podido comprobar cómo el tejido presuntivo del tórax continua dividiéndose incluso hasta las 24h DFP. Aparte de estas diferencias, se han descrito otras significativas entre la regulación génica que tiene lugar en el apéndice y la pared corporal. A pesar de que el tórax y los apéndices tienen en común la subdivisión A-P y D-V, responden de forma diferente ante señales como las de las vías Dpp y Wg, y a la función de los genes Hox (Sánchez-Herrero y Morata, 1999). Es decir, existe una regulación próximo-distal muy diferente que se debe tener en cuenta a la hora de concluir las posibles funciones de los genes Hox como reguladores del crecimiento de los órganos.

3. Requerimiento temporal de genes Hox

Los primeros experimentos de análisis clonal de un gen Hox (*Ubx*) en distintos momentos del desarrollo larvario sugerían que este gen probablemente se requería de forma continua hasta al menos larva III. A partir de ese momento, el fenómeno de perdurancia hacía que algunas células no respondieran a la falta de este gen igual que otras (Morata y García-Bellido, 1976). Experimentos posteriores en los que se observaba la expresión génica en discos imaginales mutantes para genes Hox confirmaban que estos genes regulan la expresión génica de forma continua en el desarrollo (Orenic y col., 1993; Casares y Mann, 1998; Roch y Akam, 2000; Rozowski y Akam, 2002; Joshi y col., 2006; Pavlopoulos y Akam, 2011). Para el caso de *Ubx* y

el desarrollo del patrón en el disco de halterio, numerosos estudios han abordado este tema (Weatherbee y col., 1998; Shashidhara y col., 1999; Galant y col., 2002; Prasad y col., 2003; Hersh y Carroll, 2005; Crickmore y Mann, 2006; de Navas y col., 2006; Makhijani y col., 2007). Es de destacar, sin embargo, que todos estos trabajos se refieren a cambios de expresión regulados por *Ubx* en la bolsa ("pouch") del halterio y no en la región que estudiamos (zona presuntiva de notum). Sin embargo, dado que el patrón de genes necesarios para la formación de la zona homóloga en el disco de ala, como *eyegone*, *homothorax* o *tail-up*, evoluciona en el desarrollo del notum presuntivo durante los distintos estadios larvarios (Azpiazu y Morata, 2000; Casares y Mann, 2000; Aldaz y col., 2003; de Navascués y Modolell, 2007), y que ambos discos (ala y halterio) crecen de forma proporcionada en esta zona durante el periodo larvario, suponemos que *Ubx* también regula el patrón y el crecimiento en esa región de forma progresiva durante los periodos larvario y pupal.

En contraste con estos requerimientos, hemos demostrado que, al menos para la distinción del segmento A2 respecto al A1 en el adulto (estudiado en la combinación mutante *iab-2^{R3}/abd-A-Gal4*), la expresión de *abd-A* no se necesita durante el periodo larvario, sino sólo en el periodo pupal. Sin embargo, para formar un segmento abdominal en el disco, proceso estudiado en la combinación *MS248-Gal4 UAS-abd-A*, se requiere expresión de *abd-A* tanto durante el periodo larvario como pupal. La expresión solo larvaria impide la formación correcta del notum, pero no da características abdominales; la expresión sólo pupal produce mínimos efectos. Estos experimentos sugieren que para especificar un segmento abdominal A2, A3 o A4 como distinto del A1, en situación silvestre, basta con la expresión de *abd-A* en pupa. Sin embargo, para pasar de disco a abdomen pueden necesitarse dos procesos: 1) impedir un desarrollo de tórax: la expresión de *abd-A* en larva no desarrollaría un patrón abdomen, ni una proliferación típica del mismo. pero impediría un desarrollo normal del disco (fenotipos de notum deforme, represión de *eyg* en clones mutante, etc.), y 2) formar patrón de abdomen en el adulto; este proceso depende de *abd-A* durante pupa (patrón de expresión de *wg*, *neu*, *omb*, etc., típicos de abdomen), pero requiere una "base" previa (impedir el desarrollo de disco), sin la que no hay transformación. Es decir, *abd-A* no se requiere en larva para hacer los segmentos A2-A4 siempre que realice su función en histoblastos.

Aunque no parece ser necesario para la morfología adulta, *abd-A* se expresa en los histoblastos larvarios. Hemos visto que la falta de *abd-A* en larva produce defectos en la morfología de los mismos. La función de estas modificaciones es desconocida, y experimentos posteriores son necesarios para revelarla. Por otra parte, *abd-A* se necesita durante el periodo larvario para distintas funciones en la larva, por ejemplo, la eliminación de la expresión de *abd-A* (y otros genes Hox) se requiere para el comienzo de la autofagia en el cuerpo graso (Banreti y col., 2014) y *abd-A* es necesario igualmente en este periodo para la formación del corazón (Monier y col., 2005) o para eliminar células del SNC (Bello y col., 2003), por lo que los requerimientos temporales descritos pueden limitarse solo a la cutícula adulta. Es interesante indicar, sin embargo, que recientemente se ha publicado que en la especie de hemicordados *Schizocardium californicum*, los genes Hox sólo se activan en la zona del tronco en un momento tardío del desarrollo (larva tardía antes de metamorfosis) (González y col., 2017).

4. Genes Hox y requerimientos para formar el abdomen.

La identidad de los segmentos abdominales viene especificada por los genes Hox *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero y col., 1985; Tjong y col., 1985; Maeda y Karch, 2006). Mientras que *abd-A* y *Abd-B* mantienen en pupa los límites de expresión embrionaria, en PS7-13 y 10-14, respectivamente (Celniker y col., 1989; deLorenzi y Bienz, 1990; Karch y col., 1990; Macías y col., 1990; Kopp y Duncan, 2002; Singh y Mishra, 2014) *Ubx* se expresa en el embrión en el dominio PS5-13 (Akam y Martínez Arias, 1985; White y Wilcox, 1985a) pero en pupa su expresión en el abdomen se restringe al compartimento anterior del A1, al que da identidad (Kopp y Duncan, 2002; Singh y Mishra, 2014). De acuerdo con resultados previos

(Sánchez-Herrero y col., 1985; Tiong y col., 1985), el silenciamiento de la expresión de *abd-A* en los histoblastos produce transformaciones de los segmentos A2 y posteriores hacia A1. En nuestros experimentos, quizás por la expresión diferencial de la línea *esg-Gal4* o por los diferentes requerimientos de niveles de *abd-A* en distintos segmentos, observamos una transformación más clara en el A2 que en segmentos posteriores. Sin embargo, los adultos, aunque en las situaciones fenotípicas más severas mostraban problemas en el cierre dorsal de los segmentos, en general, formaban correctamente los terguitos. No hemos visto la ausencia de epitelio abdominal descrito en estas condiciones (Singh y Mishra, 2014), aunque hemos descrito cambios en la morfología de los histoblastos en larva. Para ver si estos cambios en la morfología celular pudiesen desencadenar, por ejemplo, modificaciones en el comportamiento migratorio de los histoblastos que explicasen el ligero efecto en el cierre dorsal que observamos habría que hacer un seguimiento in vivo del proceso proliferativo en pupa en condiciones de falta de función de *abd-A*.

Por otra parte, está descrito que la falta de *Ubx* en el embrión transforma el A1 en un segmento torácico (Lewis, 1978; Frayne y Sato, 1991). Nosotros hemos visto que el silenciamiento de su expresión en los histoblastos del A1 reduce el número de histoblastos del nido anterior dorsal en algunos casos, y las células del nido que encontramos muestran una morfología anormal (tamaño variable de los núcleos y marcaje del ADN de los mismos, y cambios en morfología celular pasando de festoneada a poligonal). Es posible que las células que componen el nido estuvieran adquiriendo una identidad diferente o también podrían estar muriendo como consecuencia de un requerimiento temprano de este gen en su especificación. Estos datos sugieren que *Ubx* es necesario para la formación de estas células en el A1. Como se comentó antes, la falta de este gen no produce, por tanto, un aumento de proliferación de los histoblastos, como se esperaría si se transformasen a células de disco imaginal.

Además, cuando observamos lo que ocurría con los individuos adultos, en los casos en los que el silenciamiento del gen se produce en el periodo larvario, encontrábamos reducido el A1, con algunas características propias del tórax o intermedias entre tórax y abdomen. En todo caso, no parece que la falta de *Ubx* confiera en larva características de disco imaginal en cuanto a la proliferación, aunque sería interesante mirar si algún marcador característico de la región presuntiva de notum que no tenga expresión en histoblastos (por ejemplo, *Eyg*) se pudiera estar activando en los casos de silenciamiento de este gen Hox en los nidos del A1.

Para estudiar el comportamiento de las células del A1 al eliminar completamente el gen *Ubx* indujimos clones mutantes para este gen. A diferencia de resultados anteriores (Morata y García-Bellido, 1976) pudimos recuperar unos pocos clones en el tejido adulto. Esto podría deberse, como se sugirió antes para los clones de ganancia de función de *abd-A*, a que en nuestro método (FLP/FRT), a diferencia del uso de Rayos X usado en aquellos experimentos, pueden originarse un mayor número de clones, y quizás la fusión de varios haga que las células mutantes en el interior del clon queden protegidas de las interacciones con las vecinas silvestres que inducirían la extrusión, permitiendo así el desarrollo de parte del clon hasta el adulto. Además, los clones mutantes *Ubx* se indujeron en un fondo heterocigótico para un mutante *Minute* y, por tanto, el ser *Minute+* homocigóticos les confería una ventaja proliferativa (Morata y Ripoll, 1975), permitiéndoles así sobrevivir y no ser extruidos por las diferencias de afinidad con el tejido circundante.

El seguimiento de estos clones en pupa muestra, en tejido fijado, claras diferencias de afinidad con el tejido circundante: los clones permanecían en el tejido hasta 96h DFP, pero en todos los casos observados se encontraban invaginados por debajo del tejido cuticular, lo que explicaría que en estudios anteriores no se recuperasen clones en el A1 del adulto. Nuestros esfuerzos por conseguir observar el comportamiento de los clones *in vivo*, no nos han permitido extraer conclusiones claras, en parte debido a la dificultad de diferenciar el marcaje de los clones de otras células presentes en el tejido en nuestra primera aproximación experimental, en la que

tratábamos de observar el comportamiento del clon junto con el comportamiento de clones gemelos (Fig. R-21 A). Además, el intervalo de tiempo seleccionado para este seguimiento *in vivo*, fue insuficiente en todos los casos. De los pocos casos que pudimos analizar *in vivo*, la tendencia del tejido mutante era permanecer sin cambios (Fig. R-21 B), manteniendo la morfología redondeada del clon y sin apenas movimiento de sus células. Sin embargo, encontramos un par de casos donde parecía observarse una dispersión de las células mutantes en el tejido (Fig. R-21 A), cuya progresión no pudimos seguir debido a la interrupción de la grabación. Por otra parte, los clones mutantes para el completo BX-C mostraban las mismas diferencias de afinidad observadas en clones mutantes para *Ubx*, y aunque no conseguimos observar clones en el adulto, si pudimos comprobar que en la mayor parte de los casos parecían comenzar a extruirse, en especial en los segmentos más anteriores. Al igual que ocurría en el caso de los clones mutantes para *Ubx*, sólo los clones grandes capaces de superar las fuertes diferencias de afinidad con el tejido que les rodea parecen capaces de progresar durante el periodo pupal.

a) Células larvarias e histoblastos: interacción y diferentes requerimientos de los genes Hox.

Por otra parte, nos parecía importante también determinar si el papel de los genes Hox en el desarrollo del tejido abdominal podría venir mediado por su función en el desarrollo de las células epidérmicas larvarias (CELs) que rodean a los nidos de histoblastos, ya que la formación de la epidermis abdominal está condicionada por las interacciones de histoblastos y CELs: la muerte de estas sería necesaria para la expansión de aquellos (Ninov y col., 2007; Bischoff y Cseresnyés, 2009; Nakajima y col., 2011; Bischoff, 2012).

De hecho, en Singh y Mishra 2014 describen que *abd-A* sería esencial en el proceso de muerte de las CELs, de manera que el silenciamiento de este gen, produciría la supervivencia de estas células, lo que impediría la correcta expansión de los histoblastos, y por tanto, la correcta formación de los segmentos abdominales. En nuestros experimentos hemos visto al inactivar *abd-A* solo falta de fusión izquierda-derecha, quizás debido a un requerimiento de este gen para la eliminación correcta de las CELs. No hemos visto, sin embargo, efectos tan drásticos como los descritos (Singh y Mishra, 2014), en los que no se diferencia tejido cuticular abdominal en el adulto, a pesar de que el origen de varias de las líneas ARNi que se probaron (Yacine Graba, Univ. Marsella) fuera aparentemente el mismo. Tampoco hemos obtenido estos fenotipos extremos con otras líneas ARNi del Vienna Drosophila Research Center (DVRC), siendo la línea elegida finalmente para nuestros experimentos, aquella con la cual tuvimos mayores efectos fenotípicos (línea UAS-*abd-A* ARNi 106155 de Vienna Drosophila Resource Center). Para el caso de los histoblastos podemos decir que los resultados de clones nulos para *abd-A* no parecen apoyar los fenotipos extremos que estos autores describen.

En el caso de *Ubx*, el silenciamiento de su expresión en las CELs con la construcción *Ubx* ARNi, tampoco produce ningún cambio drástico en el proceso de diferenciación del tejido, a pesar de que encontramos problemas de fusión entre los segmentos A1 y A2. Sin embargo, al eliminar simultáneamente *Ubx* y *abd-A* de las CELs los individuos no llegan a estado de farato. Este dato sugiere una función esencial de *Ubx* y *abd-A* en las CELs, y que la función de estos genes sería parcialmente redundante. Sería interesante determinar cuál es esta función, como afecta al crecimiento de los histoblastos y, en general, al desarrollo del individuo.

b) Papel de la ecdisona para inducir proliferación de histoblastos y dar comienzo a la formación de patrón.

La regulación hormonal es una de las claves para entender algunas de las grandes transiciones que tienen lugar a lo largo del desarrollo de los organismos multicelulares.

En el caso de los insectos holometábolos, las señales hormonales que regulan el crecimiento y el desarrollo son esencialmente dos: la hormona esteroidea 20-Hidroxiecdisona (Ecdisona) y la hormona juvenil (JH). En el caso de la ecdisona en *Drosophila*, se han descrito en detalle los picos de su expresión, que corresponden con cada uno de los eventos de muda que tienen lugar en este organismo (Kozlova y Thummel, 2000; Dubrovsky, 2005), es decir, la ecdisona actuaría como señal temporal en las principales transiciones que tienen lugar durante el desarrollo. Por otra parte, se sabe que la ecdisona es capaz de dirigir ciertos cambios transcripcionales a través de su receptor (EcR) para coordinar los procesos de apoptosis, ciclo celular y diferenciación. Sin embargo, se sabe poco acerca de cómo esta hormona podría ejercer su función controlando el ciclo celular (Champlin y Truman, 1998; Ninov y col., 2007; Mitchell y col., 2013), proceso clave en el desarrollo del abdomen de *Drosophila*, ya que los histoblastos reanudan la división celular al comienzo de la pupación. El trabajo que establece esta relación en histoblastos es el de Ninov y col., 2007, donde se describe que la Ecdisona es suficiente y necesaria para regular la entrada en proliferación de estos grupos de células. Otro trabajo en el que se plantea esta misma relación (aunque no en histoblastos) es el de Mitchell y col. en 2013, donde identifican a Wg como un factor que relaciona el EcR con el ciclo celular, controlando la expresión de Ciclina B en el margen dorso-ventral del disco imaginal de ala. Se ha publicado también que *wg* regula *stg* y la correspondiente entrada en mitosis en esta zona del disco (Johnston y Edgar, 1998; Herranz y col., 2008).

En los discos imaginales de ojo, ala y pata se ha descrito una reducción de la proliferación en los primeros estadios pupales como respuesta al pico de ecdisona que provoca la entrada en pupación (Schübiger y Palka, 1987; Milán y col., 1996; Buttita y col., 2007), mientras que en otros tejidos como histoblastos o los precursores dorsales de las células de las tráqueas ese pico provoca la entrada en proliferación (Ninov y col., 2007; Ninov y col., 2009; Djabrayan y col., 2014). Una de las posibles explicaciones para que exista un efecto tan diferente de la vía de la ecdisona de manera tejido-específica, es la existencia de diferentes isoformas para el receptor de la ecdisona (Talbot y col., 1993; Cherbas y col., 2003; Schübiger y col., 2003; Davis y col., 2005; Gautam y col., 2015). El complejo receptor de la ecdisona funciona como un heterodímero formado por la asociación del receptor de la ecdisona (EcR) y Ultraspiracle (Usp). Existen tres isoformas del EcR (EcR-A, EcR-B1 y EcR-B2) que poseen el mismo dominio de interacción con el ADN pero difieren en su dominio N-terminal. El estudio de estas isoformas ha permitido asociarlas a determinados tejidos o momentos del desarrollo. De esta manera, se ha descrito que en los discos imaginales predomina la isoforma A durante el periodo larvario, mientras que en la mayor parte de los tejidos larvarios y en los histoblastos, la isoforma predominante es la B1 (Talbot y col., 1993). La existencia de isoformas específicas de discos respecto a histoblastos podría explicar el diferente comportamiento proliferativo de ambos tipos de tejidos y podría sugerir un papel de *Ubx* y *abd-A* en determinar la expresión de isoformas específicas. Por ello, uno de los experimentos pendientes sería mirar, en discos imaginales e histoblastos, qué ocurre al poner cada una de estas isoformas activas en un fondo mutante que elimine todas ellas, es decir, expresar ectópicamente EcR-A en los histoblastos y EcR-B1 en los discos (en dicho fondo mutante) en el periodo larvario y observar los resultados.

Por otra parte, se ha descrito una conexión entre la vía de la ecdisona y la regulación de la actividad de los genes Hox (Monier y col., 2005). En este trabajo los autores describen el desarrollo del corazón adulto de *Drosophila*. El corazón adulto de *Drosophila* se forma tras la reprogramación de células ya diferenciadas que se encuentran presentes desde el estadio larvario. Este proceso se encuentra controlado por la ecdisona, al comenzar la pupación, modulando la expresión de *Ubx* y la actividad de *Abd-A*, y dirigiendo así un programa genético nuevo que lleva a la diferenciación de la cámara terminal del corazón. Pensamos por ello que quizá cambios en la expresión de las diferentes isoformas de EcR, tras el pico de ecdisona que induce la entrada en pupación, podría, por otra parte, modificar la expresión o actividad de los genes Hox y así realizar su función en el desarrollo de los nidos de histoblastos durante la

pupación. Así pues, es posible *Ubx* y *abd-A* pudieran modificar su expresión y/o actividad al entrar en pupación, por efecto de la ecdisona y sus receptores, y determinar así la expresión de genes para dar lugar al patrón de abdomen. Los genes Hox podrían ser, por tanto, reguladores de, y regulados por, la señal de ecdisona.

A pesar de no haber podido relacionar a los genes Hox estudiados con la regulación del ciclo celular, no descartamos que puedan contribuir en la regulación de la expresión de *string*, necesaria para la re-entrada en el ciclo celular (Ninov y col., 2007). Posiblemente, la regulación de estos dos genes Hox requeriría además la actividad del miR-965 (Verma y Cohen, 2015), que sería un intermediario requerido en el proceso. Si esto fuera así, podría haber dos funciones de los genes *Ubx* y *abd-A* con respecto a la proliferación de histoblastos: en el embrión, estos genes podrían fijar la ausencia de división en estas células, un suceso que no podría revertirse durante el periodo larvario; en pupa, sin embargo, se requerirían, en unión a los niveles altos de ecdisona y la presencia de las diferentes isoformas de su receptor, para activar *stg* e inducir proliferación de los histoblastos.

Nuestros resultados no apoyan claramente esta hipótesis, aunque tampoco permiten excluirla del todo. Al reducir la expresión de *Ubx* con una construcción de ARNi durante el periodo larvario se observa tejido de A1 en el adulto. Si *Ubx* se requiriese para la entrada en mitosis de los histoblastos al comienzo de la pupación, los individuos mutantes no podrían formar dicho segmento. Es interesante notar, sin embargo, que la mayor parte del segmento desaparece, y quizás la construcción ARNi no elimine completamente el producto *Ubx*. Los clones mutantes para *Ubx* en el A1, o para *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* en A1 y segmentos posteriores crecen, y algunos del A1 incluso llegan a diferenciar, indicando que las células se están dividiendo durante la pupación. Sin embargo, los clones no se pueden formar hasta que esta comienza, ya que necesitan al menos de una división y los histoblastos no proliferan hasta la pupa, y quizás la perdurancia de los productos Hox haga que en las primeras horas se pueda producir la entrada en división de histoblastos, manteniéndose luego independientemente de los genes Hox. Haría falta mejorar los métodos de inactivación génica en el periodo larvario. De cualquier forma, nuestros resultados apuntan a interesantes conexiones entre la actividad de genes Hox y los mecanismos que relacionan la proliferación y la diferenciación en el desarrollo del abdomen.

CONCLUSIONES

- 1- La expresión ectópica de *abdominal-A* en la región proximal del disco imaginal de ala, causa la diferenciación del tejido torácico hacia tejido abdominal sin alterar el patrón de división característico del tejido. Es decir, ritmo de crecimiento y diferenciación o formación del patrón parecen estar desacoplados en estas condiciones experimentales con respecto a lo que ocurre en el desarrollo normal, indicando que existen dos maneras de hacer tejido abdominal: creciendo como disco o creciendo como abdomen.
- 2- La expresión ectópica de *abdominal-A* en la región proximal del disco imaginal de ala, causa una distorsión del patrón característico de ese tejido, viéndose modificado de forma más evidente hacia un patrón tipo abdominal durante el periodo de pupación.
- 3- El silenciamiento de la expresión de *abdominal-A* en los nidos de histoblastos, no causa la reducción ni el aumento del número de células por nido, pero sí cambios en la morfología celular durante el periodo larvario..
- 4- El silenciamiento de la expresión de *Ultrabithorax* en los histoblastos del A1 causa una reducción del número de células que componen el nido, dando lugar a la desaparición parcial del segmento primero abdominal en el adulto. Por otra parte, clones de falta de función de este gen pueden llegar a diferenciar tejido torácico en este segmento a. Sin embargo, esta condición no implica un crecimiento de tipo torácico, sino que los histoblastos siguen sin dividirse durante el periodo larvario.
- 5- Para especificar un segmento abdominal como diferente de otro el gen *abdominal-A* no requiere expresarse durante el periodo larvario (aunque lo haga), bastándole la expresión en el periodo pupal. Sin embargo, la transformación de tórax en abdomen por este gen necesita de su expresión en ambos periodos, larvario y pupal.
- 6- La falta de expresión de los genes *Ultrabithorax* y *abdominal-A* en las células epiteliales politénicas que rodean los histoblastos no produce grandes alteraciones en el desarrollo, pero la ausencia combinada de ambos genes produce la muerte, revelando una acción redundante y esencial de estos genes en este tejido.

CONCLUSIONS

- 1- The ectopic expression of *abdominal-A* in the proximal region of the wing imaginal disc induces the differentiation of the thoracic tissue into abdominal one without altering the pattern of division characteristic of thorax. In other words, the rhythm of growth and differentiation, or pattern formation, seem to be uncoupled in these experimental conditions, in contrast with the normal development of the tissue. That indicates that there are two ways to make an abdominal segment: by growing as a disc or as histoblast nest.
- 2- The ectopic expression of *abdominal-A* in the proximal region of the wing imaginal disc leads to a distortion of the characteristic pattern of that tissue, being modified more clearly towards a pattern abdominal type during pupation.
- 3- Silencing of the expression of *abdominal-A* in the histoblast nests does not cause the reduction or the increase in the number of cells per nest, but it changes cell and nuclear morphology during the larval period.
- 4- Silencing of the expression of *Ultrabithorax* in the histoblast nests of the first abdominal segment causes a reduction of the number of cells that make up the nest, giving rise to the partial disappearance of the first abdominal segment in the adult. On the other hand, mutant clones for this gene can differentiate as thoracic tissue in this segment. However, this condition does not imply a growth as thoracic tissue, but the histoblasts still do not divide during the larval period.
- 5- To specify differently an abdominal segment from another one, the expression of *abdominal-A* is not required during the larval period (although it is expressed at that time), rather, it is just sufficient its expression during the pupal stages. However, the transformation of thorax into abdomen by this gene needs its expression in both periods, larval and pupal.
- 6- The lack of expression of *Ultrabithorax* and *abdominal-A* genes in the epithelial polytene cells, that surround the histoblasts, does not produce major changes in development, but the simultaneous absence of both genes leads to death, revealing an essential and redundant role of these genes in this tissue.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA y col. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. Vol. 287, Issue 5461, pp. 2185-2195.
- Adams MD, Sekelsky JJ. (2002). From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. Nat Rev Genet. Mar;3(3):189-98
- Agrawal P, Habib F, Yelagandula R, Shashidhara LS (2011). Genome-level identification of targets of Hox protein *Ultrabithorax* in *Drosophila*: novel mechanisms for target selection. Sci Rep. 1:205.
- Akam ME, Martinez-Arias A (1985). The distribution of Ultrabithorax transcripts in *Drosophila* embryos. EMBO J. Jul;4(7):1689-700.
- Akam M (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. Development. Sep;101(1):1-22.
- Akiyama T, Gibson MC (2015). Decapentaplegic and growth control in the developing *Drosophila* wing. Nature. Nov 19;527(7578):375-8.
- Aldaz S, Morata G, Azpiazu N (2003). The Pax-homeobox gene *eyegone* is involved in the subdivision of the thorax of *Drosophila*. Development. Sep;130(18):4473-82.
- Aldaz S, Morata G, Azpiazu N (2005). Patterning function of *homothorax/extradenticle* in the thorax of *Drosophila*. Development. Feb;132(3):439-46.
- Alexandre C, Baena-Lopez A, Vincent JP (2014). Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. Nature. Jan 9;505(7482):180-5.
- Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH (1998). *Zebrafish* hox clusters and vertebrate genome evolution. Science. Nov 27;282(5394):1711-4.
- Azpiazu N, Morata G (2000). Function and regulation of *homothorax* in the wing imaginal disc of *Drosophila*. Development. Jun;127(12):2685-93.
- Baena-López LA, García-Bellido A (2003). Genetic requirements of vestigial in the regulation of *Drosophila* wing development. Development. Jan;130(1):197-208.
- Baena-López LA, Pastor-Pareja JC, Resino J (2003). Wg and Egfr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs. Development. Dec;130 (26):6497-506.
- Baena-Lopez LA, Nojima H, Vincent JP (2012). Integration of morphogen signalling within the growth regulatory network. Curr Opin Cell Biol. Apr;24(2):166-72.
- Baker NE (1987). Molecular cloning of sequences from *wingless*, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos. The EMBO Journal. vol.6 no.6 pp.1765-1773.
- Banreti A, Hudry B, Sass M, Saurin AJ, Graba Y (2014). Hox proteins mediate developmental and environmental control of autophagy. Dev Cell. Jan 13;28(1):56-69.

- Basler K, Struhl G (1994) Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by Hedgehog protein. *Nature*. Mar 17;368(6468):208-14.
- Basler K (2010). Regulation of Organ Growth by Morphogen Gradients. Gerald Schwank Cold Spring Harb Perspect Biol. Jan; 2(1): a001669.
- Bate M, Martinez-Arias A (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development*. 112, pp. 755-761.
- Bateson W (1894). Materials for the study of variation treated with especial regard to discontinuity in the origin of species. Macmillan, London.
- Beachy PA, Helfand SL, Hogness DS (1985). Segmental distribution of bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *Nature*. Feb 14-20;313(6003):545-51.
- Beira JV, Paro R (2016). The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma*. Sep;125(4):573-92.
- Bellen HJ, O'Kane CJ, Wilson C, Grossniklaus U, Pearson RK, Gehring WJ (1989). P-element mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 3, 1288–1300.
- Bello BC, Hirth F, Gould AP (2003). A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron*. Jan 23;37(2):209-19.
- Bergantiños C, Vilana X, Corominas M, Serras F (2010). Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology. *Bioessays*. Mar;32(3):207-17.
- Bier E (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet*. Jan;6(1):9-23.
- Bischoff M, Cseresnyés Z (2009). Cell rearrangements, cell divisions and cell death in a migrating epithelial sheet in the abdomen of *Drosophila*. *Development*. Jul;136(14):2403-11.
- Bischoff M (2012). Lamellipodia-based migrations of larval epithelial cells are required for normal closure of the adult epidermis of *Drosophila*. *Dev Biol*. Mar 1;363(1):179-90.
- Bischoff M, Gradilla AC, Seijo I, Andrés G, Rodríguez-Navas C, González-Méndez L, Guerrero I (2013). Cytonemes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. *Nat Cell Biol*. Nov;15(11):1269-81.
- Blair SS (1995). Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays*. Apr;17(4):299-309.
- Brand AH, Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 401-15.
- Bridges CB (1935). "Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*". *J Heredity*. 26: 60–64.

- Bryant PJ (1975). Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication. J Exp Zool. Jul; 193(1):49-77.
- Burke R, Basler K (1996). Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing. Development. Jul;122(7):2261-9.
- Buttitta LA, Katzaroff AJ, Perez CL, de la Cruz A, Edgar BA (2007). A double-assurance mechanism controls cell cycle exit upon terminal differentiation in *Drosophila*. Dev. Cell. 12, 631-643.
- Calleja M, Moreno E, Pelaz S, Morata G (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. Science. Oct 11;274(5285):252-5.
- Calleja M, Herranz H, Estella C, Casal J, Lawrence P, Simpson P, Morata G (2000). Generation of medial and lateral dorsal body domains by the pannier gene of *Drosophila*. Development. Sep;127(18):3971-80.
- Campbell G, Tomlinson A (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: regulation of Dpp targets by *brinker*. Cell. 96 pp. 553–562.
- Capdevila J, Guerrero I (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. EMBO J. Oct 3;13(19):4459-68.
- Carroll SB, Grenier JK y Weatherbee SD (2001). From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design. Blackwell Publishing Limited.
- Casanova J, Sánchez-Herrero E, Morata G (1986). Identification and characterization of a parasegment specific regulatory element of the *Abdominal-B* gene of *Drosophila*. Cell 47, 627-636. 10.1016/0092-8674(86)90627-6.
- Casanova J, White RA (1987). Trans-regulatory functions in the *Abdominal-B* gene of the bithorax complex. Development. Sep;101(1):117-22.
- Casanova J, Sánchez-Herrero E, Busturia A, Morata G (1987). Double and triple mutant combinations of bithorax complex of *Drosophila*. EMBO J. Oct;6(10):3103-9.
- Casares F, Calleja M, Sánchez-Herrero E (1996). Functional similarity in appendage specification by the *Ultrabithorax* and *abdominal-A* *Drosophila* HOX genes. EMBO J. Aug 1;15(15):3934-42.
- Casares F, Mann RS (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. Nature. Apr 16;392(6677):723-6.
- Casares F, Mann RS (2000). A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. Development. Apr;127(7):1499-508.
- Castelli Gair Hombría J, Rivas ML, Sotillos S (2009). Genetic control of morphogenesis - Hox induced organogenesis of the posterior spiracles. Int J Dev Biol. 53(8-10):1349-58.

- Celniker SE, Lewis EB (1987). *Transabdominal*, a dominant mutant of the Bithorax Complex, produces a sexually dimorphic segmental transformation in *Drosophila*. *Genes Dev.* Apr;1(2):111-23.
- Celniker SE, Keelan DJ, Lewis EB (1989). The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the *Abdominal-B* domain. *Genes Dev.* Sep;3(9):1424-36.
- Champlin DT, Truman JW (1998). Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. *Development.* Jan;125(2):269-77.
- Cherbas L, Hu X, Zhimulev I, Belyaeva E, Cherbas P (2003). EcR isoforms in *Drosophila*: testing tissue-specific requirements by targeted blockade and rescue. *Development.* Jan;130(2):271-84.
- Choo SW, Russell S (2011). Genomic approaches to understanding Hox gene function. *Adv Genet.* 76:55-91.
- Choo SW, White R, Russell S (2011). Genome-wide analysis of the binding of the Hox protein Ultrabithorax and the Hox cofactor Homothorax in *Drosophila*. *PLoS One.* Apr 5;6(4):e14778.
- Cifuentes FJ, García-Bellido A (1997). Proximo-distal specification in the wing disc of *Drosophila* by the nubbin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 14;94(21):11405-10.
- Cohen B, McGuffin ME, Pfeifle C, Segal D, Cohen SM (1992). *apterous*, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev.* May;6(5):715-29.
- Cohen B, Simcox AA, Cohen SM (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development.* Feb;117(2):597-608.
- Cohen SM (1993). Imaginal disc development in *Drosophila*. *Development.* Cold Spring Harb Perspect Biol. vol.2, pp.747 -841.
- Couso JP, Bate M, Martínez-Arias A (1993). A Wingless-dependent polar coordinate system in *Drosophila* imaginal discs. *Science.* Jan 22;259(5094):484-9.
- Crickmore, Mann R (2006). Hox control of organ size by regulation of morphogen production and mobility. *Science.* 313(5783): 63--68.
- Davis MB, Carney GE, Robertson AE, Bender M (2005). Phenotypic analysis of EcR-A mutants suggests that EcR isoforms have unique functions during *Drosophila* development. *Dev Biol.* Jun 15;282(2):385-96.
- de Celis JF, Barrio R, Kafatos FC (1996). A gene complex acting downstream of dpp in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature.* May 30;381(6581):421-4.
- de Lorenzi M, Bienz M (1990). Expression of Abdominal-B homeoproteins in *Drosophila* embryos. *Development* 108, 323-329.

- de Navas LF, Garaulet DL, Sánchez-Herrero E (2006). The *Ultrabithorax* Hox gene of *Drosophila* controls haltere size by regulating the Dpp pathway. *Development*. Nov;133(22):4495-506.
- de Navascués J, Modolell J (2007). *tailup*, a LIM-HD gene, and Iro-C cooperate in *Drosophila* dorsal mesothorax specification. *Development*. May;134(9):1779-88.
- Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell*. Nov 19;75(4):741-52.
- Diez del Corral R, Aroca P, Gómez-Skarmeta JL, Cavodeassi F, Modolell J (1999). The *Iroquois* homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev*. Jul 1;13(13):1754-61.
- Djabrayan NJ, Cruz J, de Miguel C, Franch-Marro X, Casanova J (2014). Specification of differentiated adult progenitors via inhibition of endocycle entry in the *Drosophila* trachea. *Cell Rep*. Nov 6;9(3):859-65.
- Dollé P, Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Renucci A, Duboule D (1989). Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homeobox containing genes during limb pattern formation. *Nature*.342: 767–772.
- Donaldson IJ, Amin S, Hensman JJ, Kutejova E, Rattray M, Lawrence N, Hayes A, Ward CM, Bobola N (2012). Genome-wide occupancy links *Hoxa2* to *Wnt-β-catenin* signaling in mouse embryonic development.. *NucleicAcids Res*. May;40(9):3990-4001.
- Duboule D, Dollé P (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J*. May;8(5):1497-505.
- Duboule D (1991). Patterning in the vertebrate limb. *Curr. Opin. Genet. Dev*.1, 211-216.
- Duboule D, Morata G (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet*.10,358-36.
- Duboule D (2007). The rise and fall of Hox gene clusters. *Development*. Jul;134(14):2549-60.
- Dubrovsky EB (2005). Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16: 6-11.
- Eaton S, Kornberg TB (1990). Repression of ci-D in posterior compartments of *Drosophila* by engrailed. *Genes Dev*. Jun;4(6):1068-77.
- Edgar BA, Lehman DA, O'Farrell PH (1994). Transcriptional regulation of *string* (*cdc25*): a link between developmental programming and the cell cycle. *Development*. Nov;120(11):3131-43.
- Edgar BA (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat. Rev. Genet*. 7 pp. 907–916.
- Edgar BA, Kim KJ (2009). Cell biology. Sizing up the cell. *Science*. Jul 10;325 (5937).

- Foe VE, Odell GM, Edgar BM (1993). Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. The Development of *Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 149-300.
- Foronda D, Martín P, Sánchez-Herrero E (2012). *Drosophila* Hox and sex-determination genes control segment elimination through EGFR and extramacrochetae activity. PLoS Genet., 8 p. e1002874.
- Fortini ME, Skupski MP, Boguski MS, Hariharan IK (2000). A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. J Cell Biol. Jul 24;150(2):F23-30.
- Frayne EG, Sato T (1991). The *Ultrabithorax* gene of *Drosophila* and the specification of abdominal histoblasts. Dev Biol. Aug;146(2):265-77.
- Frohnhöfer HG, Lehmann R, Nüsslein-Volhard C (1986). Manipulating the anteroposterior pattern of the *Drosophila* embryo. J Embryol Exp Morphol. Oct;97 (Suppl):169–179.
- Galant R, Walsh CM, Carroll SB (2002). Hox repression of a target gene: extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. Development. 129:3115–26.
- Garcia-Bellido A, Merriam JR (1971). Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*. Dev Biol. Oct;26(2):264-76.
- Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. Nat New Biol. Oct 24;245(147):251-3.
- García-Bellido A (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. In Cell Patterning. 29: 161-178.
- Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G (1976). Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. Dev. Biol. 48, 132-147.
- Garcia-Fernández J (2005). The genesis and evolution of homeobox gene clusters. Nat Rev Genet. Dec;6(12):881-92.
- García-García MJ, Romain P, Simpson P, Modolell J (1999). Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. Development. Aug;126(16):3523-32.
- Gautam NK, Verma P, Tapadia MG (2015). Ecdysone regulates morphogenesis and function of Malpighian tubules in *Drosophila melanogaster* through EcR-B2 isoform. Dev Biol. Feb 15;398(2):163-76.
- Golic KG, Lindquist S (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. Cell. Nov 3;59(3):499-509.
- Golic KG (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. Science. May 17;252(5008):958-61.

- Gómez-Skarmeta JL, Campuzano S, Modolell J (2003). Half a century of neural pre patterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat Rev Neurosci.* Jul;4(7):587-98.
- Gonzalez P, Uhlinger KR, Lowe CJ (2017). Adult Body Plan of Indirect Developing Hemichordates Develops by Adding a Hox-Patterned Trunk to an Anterior Larval Territory. *Curr Biol.* Jan 9;27(1):87-95.
- González-Reyes A, Morata G (1990). The developmental effect of overexpressing a *Ubx* product in *Drosophila* embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. *Cell.* May 4;61(3):515-22.
- González-Reyes A, Urquía N, Gehring WJ, Struhl G, Morata G (1990). Are cross-regulatory interactions between homeotic genes functionally significant?. *Nature.* 344, 78–80.
- Goto S, Hayashi S (1999). Proximal to distal cell communication in the *Drosophila* leg provides a basis for an intercalary mechanism of limb patterning. *Development* 126: 3407-3413;
- Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R (1989). The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell.* May 5;57(3):367-78.
- Guerra M, Postlethwait JH, Schneiderman HA (1973). The Development of the imaginal abdomen of *Drosophila Melanogaster*. *Dev.Biol.* 32 (2), 361-372. 6.
- Guo Y, Flegel K, Kumar J, McKay DJ, Buttitta LA (2016). Ecdysone signaling induces two phases of cell cycle exit in *Drosophila* cells. *Biol Open.* 5(11):1648-1661.
- Hadorn E (1965). Problems of determination and transdetermination. *Brookhaven Symp. Biol.* 18, 148-161.
- Hafen E, Levine M, Gehring WJ (1984). Regulation of *Antennapedia* transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature.* 307:287–289.
- Harding K, Hoey T, Warrior R, Levine M (1989). Autoregulatory and gap gene response elements of the *even-skipped* promoter of *Drosophila*. *EMBO J.* Apr;8(4):1205-12.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* Nov;10(11):1788-95.
- Held LJ (2005). Imaginal discs. Cambridge University Press.
- Herranz H, Pérez L, Martín FA, Milán M (2008). A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the *Drosophila* wing. *EMBO J.* Jun 4;27(11):1633-45.
- Hersh BM, Carroll SB (2005). Direct regulation of knot gene expression by *Ultrabithorax* and the evolution of cis-regulatory elements in *Drosophila*. *Development.* 132:1567–77.

- Hietakangas V, Cohen SM (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet.* 43:389-410.
- Hoegg S, Meyer A (2005). Hox clusters as models for vertebrate genome evolution. *Trends Genet.* 21:421–424.
- Hombria JC, Lovegrove B (2003). Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation.* Oct;71(8):461-76.
- Hopmann R, Duncan D, Duncan I (1995). Transvection in the iab-5,6,7 region of the bithorax complex of *Drosophila*: homology independent interactions in trans. *Genetics* 139: 815 –833.
- Huang F, Dambly-Chaudiere C, Ghysen A (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development*, 111, 1087–1095.
- Hudry B, Viala S, Graba Y, Merabet S (2011). Visualization of protein interactions in living *Drosophila* embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay. *BMC Biol.* Jan 28;9:5.
- Hueber SD, Bezdan D, Henz SR, Blank M, Wu H, Lohmann I (2007). Comparative analysis of Hox downstream genes in *Drosophila*. *Development.* Jan;134(2):381-92.
- Hueber SD, Lohmann I (2008). Shaping segments: Hox gene function in the genomic age. *Bioessays.* Oct;30(10):965-79.
- Hueber SD, Weiller GF, Djordjevic MA, Frickey T (2010). Improving Hox protein classification across the major model organisms. *PLoS One.* May 25;5(5):e10820.
- Ingham PW, Baker NE, Martinez-Arias A (1988). Regulation of segment polarity genes in the *Drosophila* blastoderm by *fushi tarazu* and *even skipped*. *Nature.* 7: 331(6151):73-5.
- Ingham PW (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature.* Sep 1;335(6185):25-34.
- Ingham PW (2016). *Drosophila* segment polarity mutants and the rediscovery of the hedgehog pathway genes. *Curr Top Dev Biol.* 116:477-88.
- Irvine KD, Harvey KF (2015). Control of organ growth by patterning and hippo signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Jun 1;7(6).
- Ito K, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y, Yamamoto D (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development.* 124:761–771.
- Jazwinska A, Kirov N, Wieschaus E, Roth S, Rushlow C (1999). The *Drosophila* gene *brinker* reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell.* 96 pp. 563–573.
- Johnston LA, Edgar BA (1998). Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature.* Jul 2;394(6688):82-4.

- Joshi M, Buchanan KT, Shroff S, Orenic TV (2006). Delta and Hairy establish a periodic prepattern that positions sensory bristles in *Drosophila* legs. *Dev. Biol.*, 293 pp. 64–76.
- Karch F, Bender W, Weiffenbach B (1990). *abdA* expression in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* Sep;4(9):1573-87.
- Karch F, Weiffenbach B, Peifer M, Bender W, Duncan I, Celniker S, Crosby M, Lewis EB (1985). The abdominal region of the bithorax complex. *Cell.* Nov;43(1):81-96.
- Kassis JA, Noll E, VanSickle EP, Odenwald WF, Perrimon N (1992). Altering the insertional specificity of a *Drosophila* transposable element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 pp. 1919–1923.
- Kaufman TC, Lewis R, Wakimoto B (1980). Cytogenetic Analysis of Chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: The Homoeotic Gene Complex in Polytene Chromosome Interval 84a-B. *Genetics.* Jan;94(1):115-33.
- Kaufman TC, Seeger MA, Olsen G (1990). Molecular and genetic organization of the *Antennapedia* gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet.* 27:309-62.
- Kerridge S, Morata G (1982). Developmental effects of some newly induced *Ultrabithorax* alleles of *Drosophila*. *J Embry Exp Morphol.* 8:211–234.
- Kondo S, Ueda R (2013). Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics.* Nov;195(3):715-21.
- Kopp A, Duncan I (1997). Control of cell fate and polarity in the adult abdominal segments of *Drosophila* by *optomotor-blind*. *Development.* 124 pp. 3715-3726.
- Kopp A, Blackman RK, Duncan I (1999). *Wingless*, *decapentaplegic* and EGF receptor signaling pathways interact to specify dorso-ventral pattern in the adult abdomen of *Drosophila*. *Development.* Aug;126(16):3495-507.
- Kopp A, Duncan I, Godt D, Carroll SB (2000). Genetic control and evolution of sexually dimorphic characters in *Drosophila*. *Nature.* 408:553–559.
- Kopp A, Duncan I (2002). Anteroposterior patterning in adult abdominal segments of *Drosophila*. *Dev Biol.* Feb 1;242(1):15-30.
- Kornberg T, Sidén I, O'Farrell P, Simon M (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell.* Jan;40(1):45-53.
- Kozlova T, Thummel CS (2000). Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends Endocrinol Metab.* Sep;11(7):276-80.
- Krosi J, Sauvageau G (2000). AP-1 complex is effector of Hox-induced cellular proliferation and transformation. *Oncogene.* 19:5134–5141.
- Krumlauf R (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell.* Jul 29;78(2):191-201.

- Kuhn DT, Woods DF, Andrew DJ (1981). Deletion analysis of the *tumorous-head (tuh-3)* gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. Sep;99(1):99–107.
- Kumar JP (2001). Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development. *Nature Reviews Genetics*. 846-857.
- Lai SL, Lee T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nat Neurosci*. May;9(5):703-9.
- Lander AD (2011). Pattern, Growth and Control. *Cell*. Mar 18; 144(6): 955–969.
- Lawrence PA, Morata G (1976). Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the engrailed gene. *Dev Biol*. Jun;50(2):321-37.
- Lawrence PA, Casal J, Struhl G (1999). hedgehog and *engrailed*: pattern formation and polarity in the *Drosophila* abdomen.. *Development*. Jun;126(11):2431-9.
- Lawrence PA, Casal J, Struhl G (2002). Towards a model of the organisation of planar polarity and pattern in the *Drosophila* abdomen. *Development*. 129, 2749-2760 .
- Lawrence PA, Casal J, Struhl G (2004). Cell interactions and planar polarity in the abdominal epidermis of *Drosophila*. *Development*. Oct;131(19):4651-64.
- Lecuit T, Brook WJ, Ng M, Calleja M, Sun H, Cohen SM (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature*. May 30;381(6581):387-93.
- Lecuit T, Le Goff L (2007). Orchestrating size and shape during morphogenesis. *Nature*. Nov 8;450(7167):189-92.
- Lee T, Luo L (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*. Mar;22(3):451-61.
- Lehman DA, Patterson B, Johnston LA, Balzer T, Britton JS, Saint R, Edgar BA (1999). Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, *string/Cdc25*. *Development*.126:1793–1803.
- Lessing D, Nusse R (1998). Expression of *wingless* in the *Drosophila* embryo: a conserved cis-acting element lacking conserved Ci binding sites is required for patched-mediated repression. *Development*. 125, 1469-1476.
- Letizia A, Barrio R, Campuzano S (2007). Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the *Iroquois* genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. *Development*. Apr;134(7):1337-46.
- Lewis EB (1963). Genes and developmental pathways. *Am. Zool.* 3, 33 -56.
- Lewis EB (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. Dec 7;276(5688):565-70.

- Lewis EB (1981). Developmental genetics of the bithorax complex in *Drosophila*. in *Developmental Biology Using Purified Genes* (ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Keystone, Colorado, Vol. XXIII), edited by D. D. Brown and C. F. Fox. Academic Press, New York. pp. 189–208.
- Macias A, Casanova J, Morata G (1990). Expression and regulation of the *abd-A* gene of *Drosophila*. *Development*. Dec;110(4):1197-207.
- Madhavan MM, Schneiderman HA (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch. Dev. Biol.* 183(4): 269--305.
- Madhavan MM, Madhavan K (1980). Morphogenesis of the epidermis of adult abdomen of *Drosophila*. *J Embryo. I Exp. Morphol.* Dec;60:1-31
- Maeda RK, Karch F (2006). The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained *Development*. Apr;133(8):1413-22.
- Makhijani K, Kalyani C, Srividya T, Shashidhara LS (2007). Modulation of Decapentaplegic gradient during haltere specification in *Drosophila*. *Dev Biol.* Feb 1;302(1):243-55.
- Mann RS, Morata G (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:243-71.
- Martín FA, Herrera SC, Morata G (2009). Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development*. Nov;136(22):3747-56.
- Martin-Castellanos C, Edgar BA (2002). A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing. *Development* 129:1003–1013.
- Martinez-Arias A, Lawrence PA (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature*. Feb 21-27;313(6004):639-42.
- Maruyama R, Andrew DJ (2012). *Drosophila* as a model for epithelial tube formation. *Dev Dyn.* Jan;241(1):119-35.
- McCabe CD, Innis JW (2005). A genomic approach to the identification and characterization of HOXA13 functional binding elements. *Nucleic Acids Res.* Nov 30;33(21):6782-94.
- McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*. Jun;37(2):403-8.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science*. Dec 5;302(5651):1765-8.
- Menéndez J, Pérez-Garijo A, Calleja M, Morata G (2010). A tumor-suppressing mechanism in *Drosophila* involving cell competition and the Hippo pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 17;107(33):14651-6.

- Milán M, Campuzano S, García-Bellido A (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 23; 93(2): 640–645.
- Minami M, Kinoshita N, Kamoshida Y, Tanimoto H, Tabata T (1999). *brinker* is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. Nature. 398 pp. 242–246.
- Mitchell NC, Lin JI, Zaytseva O, Cranna N, Lee A, Quinn LM (2013). The Ecdysone receptor constrains wingless expression to pattern cell cycle across the *Drosophila* wing margin in a Cyclin B-dependent manner. BMC Dev Biol. Jul 13;13:28.
- Monedero Cobeta I, Salmani BY, Thor S (2017). Anterior-Posterior Gradient in Neural Stem and Daughter Cell Proliferation Governed by Spatial and Temporal Hox Control. Curr Biol. Apr 24;27(8):1161-1172.
- Monier B, Astier M, Sémériva M, Perrin L (2005). Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. Development. Dec;132(23):5283-93.
- Montes AJ, Morata G (2017). Homeostatic response to blocking cell division in *Drosophila* imaginal discs: Role of the Fat/Dachsous (Ft/Ds) pathway. Dev Biol. Apr 15;424(2):113-123.
- Morata G, Ripoll P (1975). Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. Dev Biol. Feb;42(2):211-21.
- Morata G, Garcia-Bellido A (1976). Developmental analysis of some mutants of the bithorax system of *Drosophila*. Wilhelm Roux Arch Dev Biol. Jun;179(2):125-143.
- Morata G, Lawrence PA (1977). Homoeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila*. Nature. Jan 20;265(5591):211-6.
- Morata G, Sánchez-Herrero E (1999). Patterning mechanisms in the body trunk and the appendages of *Drosophila*. Development. Jul;126(13):2823-8.
- Morisato D, Anderson KV (1995). Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. Annu Rev Genet. 29:371-99.
- Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ (1999). Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. Exp Cell Res. Nov 25;253(1):25-33.
- Nakajima Y, Kuranaga E, Sugimura K, Miyawaki A, Miura M (2011). Nonautonomous Apoptosis Is Triggered by Local Cell Cycle Progression during Epithelial Replacement in *Drosophila*. Mol Cell Biol. Jun; 31(12): 2499–2512.
- Nellen D, Burke R, Struhl G, Basler K (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. Cell. May 3;85(3):357-68.
- Neufeld TP, de la Cruz AF, Johnston LA, Edgar BA (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. Cell. Jun 26;93(7):1183-93.

- Neumann CJ, Cohen SM (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 124, 871-880.
- Ng M, Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM (1995). Nubbin encodes a POU-domain protein required for proximal-distal patterning in the *Drosophila* wing. *Development*. Feb,121(2):589-99.
- Ng M, Diaz-Benjumea FJ, Vincent JP, Wu J, Cohen SM (1996). Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature*. May 23;381(6580):316-8.
- Nijhout HF, Grunert LW (2010). The cellular and physiological mechanism of wing-body scaling in *Manduca sexta*. *Science*, 330 pp. 1693–1695.
- Ninov N, Chiarelli DA, Martín-Blanco E (2007). Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 134: 367-379.
- Ninov N, Manjón C, Martín-Blanco E (2009). Dynamic control of cell cycle and growth coupling by ecdysone, EGFR, and PI3K signaling in *Drosophila* histoblasts. *PLoS Biol*. Apr 7;7(4):e1000079.
- Noro B, Lelli K, Sun L, Mann RS (2011). Competition for cofactor-dependent DNA binding underlies Hox phenotypic suppression. *Genes Dev*. Nov 15;25(22):2327-32.
- Nöthiger R (1972). The larval development of imaginal discs. In *The Biology of the Imaginal Discs*. Springer Verlag. pp 1-34.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. Oct 30;287(5785):795-801.
- Nüsslein-Volhard C (1991). Determination of the embryonic axes of *Drosophila*. *Development*. 1: 1-10. PMID 1742496.
- Oh H, Irvine KD (2011). Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through bantam. *Dev Cell*. Jan 18;20(1):109-22.
- O'Keefe DD, Thomas SR, Bolin K, Griggs E, Edgar BA, Buttitta L A (2012). Combinatorial control of temporal gene expression in the *Drosophila* wing by enhancers and core promoters. *BMC Genomics*. Sep 20;13:498.
- Orenic TV, Held LI Jr, Paddock SW, Carroll SB (1993). The spatial organization of epidermal structures: hairy establishes the geometrical pattern of *Drosophila* leg bristles by delimiting the domains of achaete expression. *Development*. 118 pp. 9–20.
- Pallavi SK, Kannan R, Shashidhara LS (2006). Negative regulation of Egfr/Ras pathway by *Ultrabithorax* during haltere development in *Drosophila*. *Dev. Biol*. 296(2): 340--352.
- Pavlopoulos A, Akam M (2011). Hox gene *Ultrabithorax* regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 15;108(7):2855-60.

- Pearson JC, Lemons D, McGinnis W (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat. Rev. Genet.* 6:893–904.
- Perrimon N, Pitsouli C, Shilo BZ (2012). Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Aug 1;4(8):a005975.
- Petersen LK, Stowers RS (2011). Gateway MultiSite recombination cloning toolkit. *PLoS One.* 6(9):e24531.
- Phillips RG, Whittle JR (1993). *wingless* expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of *Drosophila* wing disc development. *Development.* Jun;118 (2):427-38.
- Prasad M, Bajpai R, Shashidhara LS (2003). Regulation of Wingless and Vestigial expression in wing and haltere discs of *Drosophila*. *Development.* 130, pp. 1537–1547.
- Prokop A, Bray S, Harrison E, Technau GM (1998). Homeotic regulation of segment-specific differences in neuroblast numbers and proliferation in the *Drosophila* central nervous system. *Mech. Dev.*, 74, pp. 99–110.
- Restrepo S, Zartman JJ, Basler K (2014). Coordination of patterning and growth by the morphogen DPP. *Curr Biol.* Mar 17;24(6):R245-55.
- Reversade B, De Robertis EM (2005). Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating morphogenetic field. *Cell.* 123 pp. 1147–1160.
- Rezsohazy R, Saurin AJ, Maurel-Zaffran C, Graba Y (2015). Cellular and molecular insights into Hox protein action. *Development.* Apr 1;142(7):1212-27.
- Ripoll P, Garcia-Bellido A (1973). Cell autonomous lethals in *Drosophila melanogaster*. *Nat New Biol.* Jan 3;241(105):15-6.
- Ripoll P (1977). Behavior of somatic cells homozygous for zygotic lethals in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* Jun;86(2 Pt. 1):357-76.
- Roch F, Akam M (2000). *Ultrabithorax* and the control of cell morphology in *Drosophila* halteres. *Development.* 127 pp. 97–107.
- Rogulja D, Rauskolb C, Irvine KD (2008). Morphogen control of wing growth through the Fat signaling pathway. *Dev Cell.* Aug;15(2):309-21.
- Roseland CR, Schneiderman HA (1979). Regulation and metamorphosis of the abdominal histoblasts of *Drosophila melanogaster*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol.* Sep;186(3):235-265.
- Rozowski M, Akam M (2002). Hox gene control of segment-specific bristle patterns in *Drosophila*. *Genes Dev.* 16 pp. 1150–1162.
- Rux DR, Wellik DM (2017). Hox genes in the adult skeleton: Novel functions beyond embryonic development. *Dev Dyn.* Apr;246(4):310-317.

- Salser SJ, Kenyon C (1996). A *C. elegans* Hox gene switches on, off, on and off again to regulate proliferation, differentiation and morphogenesis. *Development*. May;122(5):1651-61.
- Salsi V, Vigano MA, Cocchiarella F, Mantovani R, Zappavigna V (2008). Hoxd13 binds in vivo and regulates the expression of genes acting in key pathways for early limb and skeletal patterning. *Dev Biol*. May 15;317(2):497-507.
- Salvany L, Requena D, Azpiaz N (2012). Functional association between Eyegone and HP1a mediates *wingless* transcriptional repression during development.. *Mol Cell Biol*. Jul;32(13):2407-15.
- Sánchez L, Casares F, Gorfinkiel N, Guerrero I (1997). The genital disc of *Drosophila melanogaster* . II. Role of the genes *hedgehog*, *decapentaplegic* and *wingless*. *Dev. Genes Evol*. 207 pp. 229–241.
- Sanchez-Herrero E, Vernos I, Marco R, Morata G (1985). Genetic organization of *Drosophila* Bithorax complex. *Nature*. 313: 108--113.
- Sánchez-Herrero E (2013). Hox targets and cellular functions. *Scientifica (Cairo)*.738257.
- Sanson B (2001). Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation. *EMBO Rep*. Dec;2(12):1083-8.
- Schubiger G (1971). Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. Oct;26(2):277-95.
- Schubiger M, Tomita S, Sung C, Robinow S, Truman JW (2003). Isoform specific control of gene activity in vivo by the *Drosophila* ecdysone receptor. *Mech Dev*. Aug;120(8):909-18.
- Scott MP, Weiner AJ (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabithorax*, and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 41 15-41 19.
- Serrano N, O'Farrell PH (1997). Limb morphogenesis: connections between patterning and growth. *Curr Biol*. Mar 1;7(3):R186-95.
- Shashidhara LS, Agrawal N, Bajpai R, Bharathi V, Sinha P (1999). Negative regulation of dorsoventral signaling by the homeotic gene *Ultrabithorax* during haltere development in *Drosophila*. *Dev Biol*. Aug 15;212(2):491-502.
- Shearn A, Garen A (1974). Genetic Control of imaginal disc development in *Drosophila*. *Proc Natl.Acad.Sci. U S A*. Apr; 71(4): 1393–1397.
- Shemer G, Podbilewicz B (2002). LIN-39/Hox triggers cell division and represses EFF-1/fusogen-dependent vulval cell fusion. *Genes Dev*. Dec 15;16(24):3136-41.
- Shen J, Dorner C, Bahlo A, Pflugfelder GO (2008). *optomotor-blind* suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Mech Dev*. Mar-Apr;125(3-4):233-46.

- Shimell MJ, Simon J, Bender W, O'Connor MB (1994). Enhancer point mutation results in a homeotic transformation in *Drosophila*. *Science*. 264, 968-971.
- Shirras AD, Couso JP (1996). Cell fates in the adult abdomen of *Drosophila* are determined by wingless during pupal development. *Dev Biol*. Apr 10;175(1):24-36.
- Shlyueva D, Meireles-Filho AC, Pagani M, Stark A (2016). Genome-wide *Ultrabithorax* binding analysis reveals highly targeted genomic loci at developmental regulators and a potential connection to Polycomb-mediated regulation. *PLoSOne*. 11(8):e0161997.
- Simcox A (1997). Differential requirement for EGF-like ligands in *Drosophila* wing development. *Mech Dev*. Feb;62(1):41-50.
- Simon MA, Bowtell DD, Dodson GS, Lavery TR, Rubin GM (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67, 701-16.
- Singh NP, Mishra RK (2014). Role of *abd-A* and *Abd-B* in development of abdominal epithelia breaks posterior prevalence rule. *PLoS Genet*. Oct 23;10(10):e1004717.
- Singh S, Sánchez-Herrero E, Shashidhara LS (2015). Critical role for Fat/Hippo and IIS/Akt pathways downstream of Ultrabithorax during haltere specification in *Drosophila*. *Mech Dev*. Nov;138 Pt 2:198-209.
- Sivasankaran R, Vigano MA, Müller B, Affolter M, Basler K (2000). Direct transcriptional control of the Dpp target *omb* by the DNA binding protein Brinker. *EMBO J*. Nov 15;19(22):6162-72.
- Slaterry M, Riley T, Liu P, Abe N, Gomez-Alcala P, Dror I, Zhou T, Rohs R, Honig B, Bussemaker HJ, Mann RS (2011). Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between Hox proteins. *Cell*. Dec 9;147(6):1270-82.
- Spencer FA, Hoffmann FM, Gelbart WM (1982). Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell*. Mar;28(3):451-61.
- St Johnston D (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics* 3, 176-188.
- Strigini M, Cohen SM (2000). Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing. *Curr Biol*. Mar 23;10(6):293-300.
- Struhl G, White RA (1985). Regulation of the *Ultrabithorax* gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell*. Dec;43(2 Pt 1):507-19.
- Struhl G, Basler K (1993). Organizing activity of Wingless protein in *Drosophila*. *Cell*, 72, pp. 527–540.
- Struhl G, Barbash DA, Lawrence PA (1997a). Hedgehog acts by distinct gradient and signal relay mechanisms to organise cell type and cell polarity in the *Drosophila* abdomen. *Development*. 124:2155–2165.

- Struhl G, Barbash DA, Lawrence PA (1997b). Hedgehog organises the pattern and polarity of epidermal cells in the *Drosophila* abdomen. *Development*. 2143–2154.
- Tabata T, Kornberg TB (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell*. Jan 14;76(1):89-102.
- Talbot WS, Swyryd EA, Hogness DS (1993). *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* 73, 1323-1337.
- Tiong S, Bone LM, Whittle JR (1985). Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Mol Gen Genet*. 200(2):335-42.
- Tomoyasu Y, Nakamura M, Ueno N (1998). Role of Dpp signaling in pattern formation of the dorsocentral mechanosensory organ in *Drosophila melanogaster*. *Development*. pp. 4215–4224.
- Verma P, Cohen SM (2015). miR-965 controls cell proliferation and migration during tissue morphogenesis in the *Drosophila* abdomen. *Elife*. Jul 30;4.
- Wang SH, Simcox A, Campbell G (2000). Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev*. Sep 15;14(18):2271-6.
- Wang W, Kidd BJ, Carroll SB, Yoder JH (2011). Sexually dimorphic regulation of the Wingless morphogen controls sex-specific segment number in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108 pp. 11139–11144.
- Wang W., Yoder J.H. (2012). Hox-mediated regulation of *double-sex* sculpts sex-specific abdomen morphology in *Drosophila*. *Dev. Dyn.*, 241 pp. 1076–1090.
- Weatherbee SD¹, Halder G, Kim J, Hudson A, Carroll S (1998). *Ultrabithorax* regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes Dev*. May 15;12(10):1474-82.
- Weatherbee SD, Nijhout HF, Grunert LW, Halder G, Galant R, Selegue J, Carroll S (1999). Ultrabithorax function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns. *Curr. Biol*. 9, 109–115.
- Weigmann K, Cohen SM, Lehner CF (1997). Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase. *Development*. 124, 3555-3563.
- White RA, Wilcox M (1984). Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell*. Nov;39 (1):163-71.
- White RA, Wilcox M (1985a). Distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila*. *EMBO J*. Aug;4(8):2035-43.
- White RA, Wilcox M (1985b). Regulation of the distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila*. *Nature*. 318, 563 – 567.

- White RA, Lehmann R (1986). A gap gene, *hunchback*, regulates the spatial expression of *Ultrabithorax*. Cell. Oct 24;47(2):311-21.
- Williams JA, Paddock SW, Carroll SB (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. Development. Feb;117(2):571-84.
- Williams JA, Paddock SW, Vorwerk K, Carroll SB (1994). Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. Nature. 368:299–305.
- Woltering, J. M. and Durston, A. J. (2006). *The zebrafish hoxDb cluster has been reduced to a single microRNA*. Nat. Genet.6,601 -602.
- Worley MI, Setiawan L, Hariharan IK (2012). Regeneration and transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. Annu Rev Genet. 46:289-310.
- Xu T, Rubin GM (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. Development. Apr;117(4):1223-37.
- Zecca M, Basler K, Struhl G (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. Development. Aug;121(8):2265-78.
- Zecca M, Struhl G (2002). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. Development. Mar;129(6):1357-68.
- Zecca M, Struhl G (2007). Control of *Drosophila* wing growth by the vestigial quadrant enhancer. Development. Aug;134(16):3011-20.
- Zecca M, Struhl G (2010). A feed-forward circuit linking Wingless, Fat-Dachsous signaling, and the Warts-Hippo pathway to *Drosophila* wing growth. PLoS Biol. 8 p. e1000386
- Zeidler MP, Tan C, Bellaiche Y, Cherry S, Häder S, Gayko U, Perrimon N (2004). Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins. Nature Biotechnology 22, 871 – 876.
- Zhao Y, Potter SS (2001). Functional specificity of the *Hoxa13* homeobox. Development. 128:3197–3207.
- Zirin JD, Mann RS (2007). *Nubbin* and *Teashirt* mark barriers to clonal growth along the proximal-distal axis of the *Drosophila* wing. Dev Biol. Apr 15;304(2):745-58.